



陈舌, 复旦大学基础医学院生物化学与分子生物学系研究员, 博士生导师, 上海市细胞生物学学会理事。1998年获上海医科大学临床医学学士学位; 2003年获复旦大学博士学位; 2003年至2006年任美国纽约州立基础所 Research Scientist; 2006年至2013年任美国斯隆-凯特琳癌症中心 Research Associate; 2013年被复旦大学引进为研究员。课题组从事肿瘤、代谢性疾病及神经发育领域基础研究。迄今已在 *Nature*、*Science*、*Mol Cancer*、*J Hepatol*、*Dev Cell*、*Oncogene* 等国际知名期刊上发表 SCI 论文 60 余篇。获上海市科技进步奖二等奖、上海市医学科技奖一等奖/二等奖、中国抗癌协会科技奖二等奖等多项奖励, 获多项国家自然科学基金和上海市自然科学基金面上项目资助。获授权抗癌药物疗效评估中国发明专利 2 项并申请国际 PCT 专利 1 项。

## 非编码RNA在肿瘤液体活检中的研究进展

邓怡然<sup>1</sup> 陈舌<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>上海市胸科医院/上海交通大学医学院附属胸科医院检验科, 上海 200030; <sup>2</sup>复旦大学基础医学院, 上海 200032)

**摘要** 液体活检是一种基于分析体液样本中的生物标志物来诊断疾病、监测疾病进展和评估疗效的非侵入性的新型微创诊断技术。液体活检主要包括探查和检测循环肿瘤细胞、ctDNA、非编码RNAs和细胞外囊泡等。非编码RNA之前被认为是一类无功能的RNA, 但近年来研究表明它们在肿瘤的发病机制中扮演着重要的角色。它们构成了基因调控的一个重要层面, 其表达水平在多种癌种中呈现失调势态, 这提示了它们作为肿瘤生物学标志物的临床应用潜力。飞速发展的高通量测序技术使得在泛癌领域建立非编码RNA表达谱的分子表征成为可能。该文系统阐述了非编码RNA作为非侵入性肿瘤标志物的研究进展, 评估了其作为肿瘤生物学标志物的适用性, 同时总结了近期的检测技术突破对肿瘤分子标志物发展的影响。

**关键词** 液体活检; 分子诊断; 非编码RNA; 高通量测序; 肿瘤标志物

## Research Progress of Non-Coding RNAs in Tumor Liquid Biopsy

DENG Yiran<sup>1</sup>, CHEN She<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; <sup>2</sup>School of Basic Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Liquid biopsy, a novel non-invasive minimally invasive diagnostic technique, is based on the analysis of biomarkers in body fluid samples, to diagnose disease, monitor disease progression and evaluate efficacy. Liquid biopsy mainly involves the exploration and detection of CTCs (circulating tumor cells), ctDNA (circulating tumor DNA), non-coding RNAs and extracellular vesicles. Non-coding RNAs were previously considered to be a class of non-functional RNAs, but recent studies have shown that they play an important role in the pathogenesis of tumors. They constitute an important level of gene regulation, and their expression levels are dysregulated in various cancer types, which suggests their potential for clinical application as tumor biomarkers. The rapid development of high-throughput sequencing technology has made it possible to establish non-coding RNA expression profiles in pan-cancer. This article systematically reviews the research progress of non-coding RNAs as non-invasive tumor biomarkers, evaluates their applicability as tumor biomarkers, and summarizes the impact of recent detection technology breakthroughs on the development of tumor biomarkers.

收稿日期: 2023-10-25

接受日期: 2023-12-08

国家自然科学基金面上项目(批准号: 82173308)和上海市科委面上项目(批准号: 23ZR1412600)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54237223, E-mail: shechen@fudan.edu.cn

Received: October 25, 2023

Accepted: December 8, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82173308), and Shanghai Science and Technology Commission Project (Grant No.23ZR1412600)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54237223, E-mail: shechen@fudan.edu.cn

lating tumor DNA), ncRNAs (non-coding RNAs) and extracellular vesicles. ncRNAs have long been considered as useless RNAs, but recent studies have shown that they play an important role in the pathogenesis of tumors. They constitute an important aspect of gene regulation, and their expression levels are always dysregulated in multiple cancer species, suggesting their clinical potential as tumor biomarkers. The rapid development of high-throughput sequencing technology has made it possible to establish comprehensive molecular characterization of ncRNAs expression profiles in the field of pan-cancer. This paper systematically reviews the research progress of ncRNAs as non-invasive tumor markers, evaluates its applicability as tumor biomarkers, and summarizes the effect of recent breakthroughs in detection technology on the development of tumor molecular markers.

**Keywords** liquid biopsy; molecular diagnostics; ncRNAs; high-throughput sequence; tumor biomarkers

液体活检是指对血液、唾液、尿液等标本进行取样和分析,从而达到疾病诊断和预后评估等目的。与传统的组织活检不同,液体活检通常是非侵入性或微创性的,可用于评估其他技术手段难以探测的器官疾病和/或健康状况<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞在凋亡、坏死或转移等过程中将核酸等遗传信息或蛋白质等物质释放到体液循环中,通过检测这些标志性分子,可以对肿瘤实现早期发生/复发监测、辅助诊断分型及治疗方案调整,具有无创性、患者依从性良好及可动态监测等优点。液体活检的检测指标主要包括 CTCs、循环肿瘤DNA(ctDNA)、ncRNAs和细胞外囊泡等。

ctDNA作为循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)的一类,来源于肿瘤细胞,主要由单链或者双链DNA及它们的混合物构成,可以反映肿瘤的异质性。ctDNA是高度碎片化的,长度在180到200个碱基对之间。作为一种生物标志物,ctDNA易于获取且可靠。然而,ctDNA在cfDNA中占比较低,早期或治疗缓解后ctDNA含量低至0.01%~1.70%,在中晚期肿瘤患者中为8%~10%。同时其半衰期较短(16分钟至13小时),经手术或全身治疗后可迅速被清除<sup>[2-3]</sup>。虽然ctDNA可以反映患者体内肿瘤的全景数据,全面反映与肿瘤组织相同的突变基因组信息,例如突变、缺失、插入、拷贝数变异及甲基化等,但目前缺乏成熟完善和可识别的衡量标准,以及缺乏其在肿瘤进展过程中的突变定律,并且ctDNA会被巨噬细胞实时清除,导致循环中含量极低,由此ctDNA作为非侵入性的早期肿瘤生物标志物存在较大的局限性。相较于ctDNA的低含量、组织来源不明确、易被降解等特点,ncRNAs因其高丰度和相对的稳定性,近年来作为液体活检的肿瘤标志物得到了广泛的关注。本文

我们总结了几种主要的ncRNAs作为液体活检肿瘤标志物的最新进展。另外,我们还总结了ncRNAs量化的最新技术进展,以及评估了这些技术进步将如何影响液体活检肿瘤标志物的发展。

## 1 ncRNAs的分类及生物学功能

人类基因组计划表明基因组中只有不到2%的蛋白质编码序列,其余98%的非编码核酸序列被普遍认为是无用的“垃圾”和“噪音”,因为它们绝大多数只是转录成RNA,并没有继续翻译成功能蛋白<sup>[4-5]</sup>。DNA元素百科全书项目(Encyclopedia of DNA Elements Project, ENCODE)发布的最新报告显示至少80%的基因组,特别是之前被认为是剩余的“垃圾”序列具备转录成ncRNAs的功能<sup>[6]</sup>。利用高通量测序技术和生物信息学方法探索到ncRNAs具备重要的生理和病理功能,参与一些重大疾病如肿瘤、心血管和神经系统疾病的进展。ncRNAs可以分为长链非编码RNA(long-chain non-coding RNA, lncRNA)、环状RNA(circulating RNA, circRNA)和小非编码RNA。其中小非编码RNA又可以分为微小RNA(microRNA, miRNA)、小核仁RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)等<sup>[7-10]</sup>(图1)。ncRNAs根据组成结构、表达丰度及稳定性等多方面的差异,它们在临床具体的应用方面也各有不同(表1)。ncRNAs在表观遗传、转录以及转录后等多个水平参与调控基因的表达,调节肿瘤的发生发展,在恶性肿瘤发展的不同阶段表达不同,已成为肿瘤分子生物学研究领域的新热点。

### 1.1 lncRNAs

lncRNAs是一类长度超过200 nt,不编码蛋白质的RNA分子。其可以作为具有编码功能的基因的全

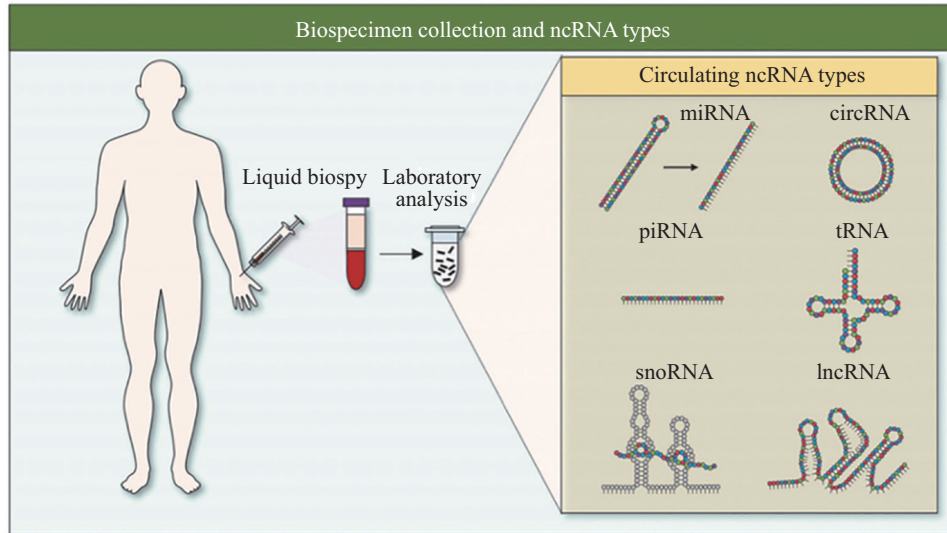


图1 非编码RNA在肿瘤液体活检中的研究类型(根据参考文献[7]修改)

Fig.1 Types of non-coding RNAs in tumor liquid biopsy (modified from reference [7])

表1 ncRNAs在癌症液体活检标志物开发中的适用性

Table 1 Suitability of ncRNAs for developing liquid biopsy markers in cancer

类型 Type	长度 Length	丰度 Abundance	稳定性 Stability	临床应用前景 Clinical application
lncRNAs	>200 nt	Low	Low	Diagnostic Prognostic Predictive (treatment response)
miRNAs	18-25 nt	High	High	Diagnostic Prognostic Predictive (treatment response)
circRNAs	200-2 000 nt	Low	High	Diagnostic
SnoRNAs	60-300 nt	High	High	Prognostic Predictive (treatment response)

部或部分天然反义转录物,位于基因之间或者内含子内,还有部分来自假基因。它们参与等位基因表达的表观遗传调控,作为蛋白质复合物的支架或作为特定靶分子的诱饵以限制靶分子的功能,作为小非编码RNA的前体或参与转录后基因调控<sup>[11]</sup>。

### 1.2 miRNAs

miRNAs是一类长度为18~25 nt的内源性单链核苷酸,与靶基因的3'-UTR结合,通过调节RNA翻译来控制多种细胞生物学过程。目前miRNAs是肿瘤中研究最多的ncRNAs,其在多种体液(如血液、尿液、唾液等)中具备较高的丰度和稳定性,因此miRNAs已被视为最有前途的肿瘤液体活检生物标志物之一<sup>[12-13]</sup>。

### 1.3 circRNAs

circRNAs是一类不具有5'帽结构和3'末端

poly(A)尾结构的非编码RNA分子,通过外显子、内含子或外显子-内含子反向剪接机制形成的闭合环状结构<sup>[14]</sup>。尽管它们过去被认为是由异常剪接产生的“垃圾”分子,目前生物体中已经发现了数千种circRNAs,具有重要的生物学功能。它们充当miRNA和蛋白质海绵或支架,也可以作为利用内部核糖体进入位点进行无帽翻译的模板。

### 1.4 snoRNAs

snoRNAs是一类长度为60~300 nt,表达量丰富的ncRNAs,主要定位在细胞核中,负责RNA转录后修饰和成熟。基于保守序列元件特点,snoRNAs分为C/D盒或H/ACA盒。C/D盒snoRNAs主要是C(RUGAUGA, R=嘌呤)和D(CUGA)盒,还包含位于snoRNA分子中心部分的C和D基序(简称为C'和D'盒)的额外保存较少的副本<sup>[15]</sup>。在功能上,C/D盒

结构有助于 snoRNAs 形成茎环结构, 并介导其与核糖核蛋白 56/58 (nucleolar protein 56/58, NOP56/58)、小核核糖核蛋白 13 (small nuclear ribonucleoprotein 13, SNU13) 和 RNA 甲基转移酶纤维蛋白 (RNA 2'-O-methyl-transferase fibrillar protein, FBL) 相互作用。其中, FBL 可以甲基化修饰与 snoRNA 碱基互补配对的 rRNA、tRNA 与 mRNA 等。H/ACA 盒子结构使 SNORA 分子能够与 NOP10、NHP2、GAR1 和 DKC1 形成 RNPs, 并利用与 snoRNA 的互补诱导 rRNA 的假尿嘧啶化<sup>[16-18]</sup>。许多 snoRNAs 在肿瘤中失调, 其表达水平同肿瘤分期、肿瘤转移等具有相关性, 影响肿瘤进展。

### 1.5 其他 ncRNAs

体液中也检测到其他几种类型的 ncRNAs。与蛋白 piwi 相互作用的 RNA (piwi-interacting RNAs, piRNAs) 是一类由哺乳动物生殖细胞分离得到的长度为 26~31 nt 的 ncRNA, 其大小与 miRNA 相当但缺乏其序列保守性。在功能上, piRNA 与 piwi 蛋白相互作用形成 RNA-蛋白复合物, 诱导表观遗传转录和转录后基因沉默。PiRNAs 在多种肿瘤中表达失调。转运 RNA (transfer RNAs, tRNAs) 是一种 76~90 nt 的 RNA, 其 3' 端可以在氨酰-tRNA 合成酶的催化下, 连接特定种类的氨基酸, 作为遗传物质和氨基酸序列之间的物理联系。在功能上, tRNA 已知可将氨基酸转运到核糖体进行蛋白质合成。tRNAs 在肿瘤中比正常组织具有更高的周转率, 其表达水平在应激下的肿瘤组织中显著升高。

## 2 ncRNAs 在肿瘤诊断及预后评估中的应用

肿瘤细胞可以通过名为循环 ncRNAs 的特殊机制将 ncRNAs 递送到体液, 例如血浆、血清和肿瘤患者的胞吐液等。肿瘤患者血液中循环的 ncRNAs 可以被大量检测到并用作肿瘤的生物标志物<sup>[19-20]</sup>。

我们以非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 为例, 简述几种 ncRNAs 在肿瘤诊断和预后评估中的实际应用。一项涉及 108 名 NSCLC 患者和 54 名匹配健康对照的前瞻性队列研究表明, 血清 miR-141 在 NSCLC 患者中的表达水平显著升高且其表达水平可以区分淋巴转移和远处转移。亚型分析显示, miR-141 的表达与肺腺癌而非鳞状细胞癌的总生存率相关<sup>[21-22]</sup>。XU 等<sup>[23]</sup>使用多因素 Cox 回归分析发现了 miR-18a、miR-20a 和 miR-92a 水平

升高与患者不良预后显著相关, 因而将其作为非小细胞肺癌预后的生物标志物。痰液中的几种 miRNAs, 包括 miR-21、miR-143、miR-155、miR-210 和 miR-372, 也被报道可以用于早期检测非小细胞肺癌<sup>[24]</sup>。lncRNAs 的研究揭示了几种潜在的非小细胞肺癌诊断和预后的生物标志物。lncRNAs XIST 和 HIF1A-AS1 在非小细胞肺癌患者血清样本中含量显著升高, 而其在术后的含量显著减少。利用 ROC 曲线进行分析, 发现 NSCLC 患者与对照组存在明显的差异 lncRNAs XIST 和 HIF1A-AS1 的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 分别为 0.834 和 0.876。lncRNAs XIST 联合 HIF1A-AS1 可作为 NSCLC 的预测性生物标志物<sup>[25]</sup>。有研究表明, 在肺癌细胞中过表达的 circRNAs 有可能在体液循环中被释放出来, 在早期和晚期 NSCLC 患者的血浆中确实可观察到 circRNAs 差异表达: 两个过表达的 circRNAs (hsa-circ-0005963 和 hsa-circ-0003958), 两个低表达的 circRNAs (hsa-0086414 和 hsa-circ-0001936)<sup>[26]</sup>。snoRNAs 在基因表达的早期阶段起着至关重要的作用。最近, 在非小细胞肺癌患者的痰样本中发现了两组 snoRNAs: snoRD-66 和 snoRD-78, 二者联合诊断对 NSCLC 的检测灵敏度<sup>[27]</sup>。

## 3 ncRNAs 相关的新兴检测技术

ncRNAs 属于核酸物质, 常规的 RT-qPCR、数字 PCR (digital PCR, dPCR) 和微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)、Northern 印迹杂交、基因芯片和 RNA 测序是目前检测 ncRNAs 常用的方法<sup>[28]</sup>。Northern blot 特异性较高, 但是对样本要求高、操作繁琐、耗时长且存在放射污染等问题。RT-qPCR 是定量检测痕量 ncRNAs 的金标准, 具有较高的灵敏度、重现性和准确性。dPCR 和 ddPCR 可在更加微小体积或液滴中进行检测并直接精确定量样品中的 ncRNAs, 两种 PCR 检测技术通过数学的力量提高检测的信噪比。但是, PCR 技术对样品准备、检测设备、人员等的要求较高, 难以在有限资源下进行大规模使用。芯片和 RNA 测序具有高通量、高自动化和平行性等特点, 但又受限于特异性较低、数据分析繁杂、价格昂贵等问题。因此, 需要开发出新的检测技术, 用于实际的临床工作中。

### 3.1 高通量测序

二代测序 (next generation sequence, NGS) 可以

对全基因组或转录组进行量化,为非侵入性癌症生物标志物开发提供了极大的便捷。基于肿瘤组织的大规模公开测序数据库为研究人员提供了对每种癌症的分子特征的见解。对于大多数癌症类型,有多个公开可用的大规模数据集,如癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA),数据集可以准确评估识别特定癌症中持续失调的基因<sup>[29]</sup>。此外根据肿瘤组织中目标基因的表达水平,可以估计其在循环中的丰度值,进而评估其作为液体活检标志物的可能性。近年来,NGS技术在液体活检生物标志物开发中的应用有了显著的发展。在过去的十年中,NGS的成本已经显著降低,允许对更多的临床生物标本进行测序,且可生成具有更高覆盖深度的数据集的能力。NGS技术对于分子非侵入性癌症生物标志物的发展尤为重要,因为大多数来自肿瘤的信号强度通常在体循环中较低<sup>[30-31]</sup>。NGS技术的产生提高了低表达转录物生成高分辨率数据的机会,同时增强了检测循环中罕见癌症衍生转录产物的能力。此外,单细胞测序技术的出现显著提高了低输入测序的分辨率。低输入测序的改进允许对有限起始核酸模板的样本(如血浆和血清)进行准确的转录组定量<sup>[32]</sup>。总的来说,这些技术进步将能够对循环中的分子表达谱进行更为全面的评估。

### 3.2 人工智能

开发肿瘤生物标志物的主要挑战之一是肿瘤存在较大的异质性。各种类型肿瘤组织的分子表达谱显示,目前还没有共识的单一基因生物标志物可以准确区分肿瘤组织和正常组织。为了克服单个基因有限的敏感性和特异性,多种生物标志物已被结合起来开发,以用于肿瘤鉴定。然而,分析大量的测序数据既复杂又具有挑战性。克服疾病异质性的主要策略之一是利用生物信息学算法进行建模测算<sup>[33]</sup>。机器学习包含一组计算技术,这些技术被广泛用于将大量测序信息简化为更易解释的低维输出。基于人工智能的机器学习方法,与传统的单一生物标志物相比,在开发肿瘤生物标志物方面具有显著优势。机器学习算法已经越来越多地被应用于包括癌症在内的多种疾病的液体活检生物标志物开发。例如,研究人员综合Lasso回归、随机森林算法、加权基因共表达分析等技术对TCGA中肺癌相关的所有lncRNAs数据进行分析,筛选到MIR3945HG等8个诊断价值高且与预后密切相关的肿瘤标志物<sup>[5]</sup>。研究人员使用多

种癌症类型的79个血浆外泌体RNA-seq(exoRNA-seq)数据集研究了不同长链外泌体物种(如lncRNAs和circRNAs)的不同变异(即差异表达、选择性剪接、选择性聚腺苷化和差异编辑),并进一步整合exoRNA-seq数据集和65个游离RNA(circulating free RNA, cfRNA-seq)数据集,以确定肝癌患者的复发性变异<sup>[34]</sup>。机器学习模型被用于总结和识别肝癌的3种ncRNAs的特征。虽然机器学习方法的使用无疑将在未来变得更加普遍,但为了释放这种方法的全部潜力,需要克服几个基本障碍。特别是,数据集的质量决定了机器学习方法被用于开发生物标志物的性能。考虑到循环中肿瘤衍生分子信号强度较低,未来提高循环分子信号的整体分辨率至关重要。

### 3.3 单分子荧光成像

作为内源性非编码RNA的重要代表,miRNA在许多生物过程,包括基因表达、细胞分化、增殖和凋亡中发挥着重要的调控功能。一种癌症的进展通常伴随着多个miRNA水平同时发生变化。因此,同时且灵敏地检测多个miRNA对于临床诊断和基础研究都很重要。研究人员提出单分子荧光成像分析方法,该方法利用一种捕获抗DNA/RNA抗体(S9.6抗体)即可同时超灵敏检测多种miRNAs<sup>[35]</sup>。例如将miR-21和miR-122杂交的两个互补DNA(complementary DNA, cDNA)在其5'末端分别用Cy3(cDNA1)和Cy5(cDNA2)染料标记,杂交后,miR-21/cDNA1和miR-122/cDNA2复合物均被S9.6捕获在盖玻片表面预先修饰的抗体上。随后,盖玻片表面的Cy3和Cy5染料通过单分子荧光设置成像。miR-21和miR-122的含量分别通过计算来自绿色和红色通道中Cy3和Cy5染料分子的图像点进行量化。该方法仅使用一种捕获探针就实现了对双miRNA物种的同步检测,另外该探针还可以通过添加更多的荧光标记基因拓宽miRNA物种检测范围。该传感器不仅具有较高的灵敏度也有很好的特异性,而且有望在临床诊断中发挥重要作用。

### 3.4 纳米测序技术

纳米孔检测技术作为20世纪90年代中期发展至今的一种分析手段,因其无标记、高灵敏等优势,已经逐渐成为化学、生物学领域内一种重要的单分子级别的分析检测方法。而基于纳米孔的核酸分析是纳米孔检测领域中最成功的方向,尤其是基于纳米孔测序方法开发的第三代测序技术已经被

广泛地应用于生命科学领域的研究中。因此, 纳米孔检测技术有望在ncRNAs的分析检测中作出独特的贡献。纳米孔蛋白被包备在多聚物膜上并浸泡于电解质溶液中。当赋予一恒定的电压时, 电解质离子会通过纳米孔并在膜两侧产生电流。在马达蛋白的作用下, 单链DNA或RNA会经纳米孔从负极一侧(cis)向正极一侧(trans)通过。不同核苷酸的体积、带电性质不同, 引起膜两侧电流产生变化, 由此可以通过记录电流的变化及对电流图形的识别进行测序。LINDEMANN等<sup>[36]</sup>基于纳米孔测序技术针对循环血RNA、cDNA进行测序分析, 这可用于循环血lncRNA的序列分析、鉴定和定量检测。该技术具有高通量、实时、超长读值、操作简便等诸多优点。

### 3.5 表面增强拉曼光谱液体活检技术

拉曼光谱是一种基于光与物质间相互作用的无损分析技术, 属于非弹性散射效应。此技术通过记录光与物质作用过程中物质内部分子或晶格振动能级的改变, 获得表征分子结构及成分特征的光谱信息。YAO等<sup>[37]</sup>将双工特异性核酸酶信号扩增策略应用于非标记拉曼检测, 对miRNA进行高灵敏定量分析, 线性范围从0.33 fmol/L到3.30 pmol/L, 成功应用于监测不同癌细胞系和人体血清中miR-21的表达水平。

## 4 总结与展望

液体活检是非侵入性的, 比传统的组织活检更经济。它们有可能检测从多个转移部位脱落的物质, 而不是分析活检的一小块组织, 因此液体活检有可能更好地检测肿瘤各部位的异质性。液体活检可以连续观察治疗后的变化。它们是一种比组织检测更容易监测治疗反应的手段。然而, 目前液体活检尚不能够作为诊断肿瘤等疾病的标准方法, 它们主要用作组织活检的补充检测, 需要和组织样本的基因检测联合判读。与组织活检相比, 液体活检的敏感性和特异性通常较低, 假阳性和假阴性的概率较高, 这可能会延误患者接受正确诊断和适当治疗。此外, 目前的液体活检在预测阳性患者肿瘤起源方面缺乏所需的准确性。ncRNAs在肿瘤诊断、预后评判、疗效及耐药预测等方面具有重要的意义。ncRNAs作为一种创伤性小、特异度和敏感度均较高的检测方法, 在未来无创诊断、提供新的治疗靶点和预后信息等中的价值将得到进一步的提高。

## 参考文献 (References)

- [1] CROWLEY E, DI NICOLANTONIO F, LOUPAKIS F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(8): 472-84.
- [2] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-90.
- [3] LEUNG F, KULASINGAM V, DIAMANDIS E P, et al. Circulating tumor DNA as a cancer biomarker: fact or fiction [J]? *Clin Chem*, 2016, 62(8): 1054-60.
- [4] COLLINS F S, LANDER E S, ROGERS J, et al. Finishing the euchromatic sequence of the human genome [J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 931-45.
- [5] WILUSZ J E, SUNWOO H, SPECTOR D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(13): 1494-504.
- [6] DUNHAM I, KUNDAJE A, ALDRED S F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57-74.
- [7] LAI F, OROM U A, CESARONI M, et al. Activating RNAs associate with mediator to enhance chromatin architecture and transcription [J]. *Nature*, 2013, 494(7438): 497-501.
- [8] WANG J, ZHU S, MENG N, et al. ncRNA-encoded peptides or proteins and cancer [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(10): 1718-25.
- [9] WINKLE M, EL-DALY S M, FABBRI M, et al. Noncoding RNA therapeutics: challenges and potential solutions [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8): 629-51.
- [10] WANG W T, HAN C, SUN Y M, et al. Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development [J]. *J Hematol*, 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0748-z.
- [11] BOON R A, JAE N, HOLDT L, et al. Long Noncoding RNAs from clinical genetics to therapeutic targets [J]? *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(10): 1214-26.
- [12] SHIGEYASU K, TODEN S, ZUMWALT T J, et al. Emerging role of microRNAs as liquid biopsy biomarkers in gastrointestinal cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10): 2391-9.
- [13] OKUGAWA Y, TOIYAMA Y, GOEL A. An update on microRNAs as colorectal cancer biomarkers: where are we and what's next [J]? *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14(8): 999-1021.
- [14] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-91.
- [15] BALAKIN A G, SMITH L, FOURNIER M J. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions [J]. *Cell*, 1996, 86(5): 823-34.
- [16] KISHORE S, GRUBER A R, JEDLINSKI D J, et al. Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing [J]. *Genome Biol*, 2013, 14(5): R45.
- [17] KISS-LÁSZLÓ Z, HENRY Y, KISS T. Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA [J]. *EMBO J*, 1998, 17(3): 797-807.
- [18] HENRAS A K, DEZ C, HENRY Y. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2004, 14(3): 335-43.

- [19] SONG J, LIN Z, LIU Q, et al. MiR-192-5p/RB1/NF- $\kappa$ Bp65 signaling axis promotes IL-10 secretion during gastric cancer EMT to induce Treg cell differentiation in the tumour microenvironment [J]. *Clin Transl Sci*, 2022, doi: 10.1002/ctm2.992.
- [20] GU X, MA S, LIANG B, et al. Serum hsa\_tsr016141 as a kind of tRNA-derived fragments is a novel biomarker in gastric cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.679366.
- [21] ROA W H, KIM J O, RAZZAK R, et al. Sputum microRNA profiling: a novel approach for the early detection of non-small cell lung cancer [J]. *Clin Invest Med*, 2012, 35(5): E271-E81.
- [22] YANG J, LU J, YIN N, et al. miR-622 counteracts the NUAK1-induced gastric cancer cell proliferation and the antioxidative Stress [J]. *Dis Markers*, 2022, doi: 10.1155/2022/9616764.
- [23] XU X, ZHU S, TAO Z, et al. High circulating miR-18a, miR-20a, and miR-92a expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(1): 21-31.
- [24] ZHAO Y. The diagnostic and prognostic role of circulating miR-141 expression in non-small-cell lung cancer patients [J]. *Int J Clin Exp Patho*, 2018, 11(5): 2597-604.
- [25] TANTAI J, HU D, YANG Y, et al. Combined identification of long non-coding RNA XIST and HIF1A-AS1 in serum as an effective screening for non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Patho*, 2015, 8(7): 7887-95.
- [26] QIU M, XIA W, CHEN R, et al. The circular RNA circPRKCI promotes tumor growth in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 2839-51.
- [27] LIAO J, YU L, MEI Y, et al. Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-198.
- [28] LEE I, BAXTER D, LEE M Y, et al. The importance of standardization on analyzing circulating RNA [J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(3): 259-68.
- [29] COLLISSON E A, CAMPBELL J D, BROOKS A N, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 511(7511): 543-50.
- [30] KIM J, BOWLBY R, MUNGALL A J, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 169-75.
- [31] KOBOLDT D C, FULTON R S, MCLELLAN M D, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 61-70.
- [32] MUZNY D M, BAINBRIDGE M N, CHANG K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407): 330-7.
- [33] KO J, BALDASSANO S N, LOH P L, et al. Machine learning to detect signatures of disease in liquid biopsies: a user's guide [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(3): 395-405.
- [34] ZHU Y, WANG S, XI X, et al. Integrative analysis of long extracellular RNAs reveals a detection panel of noncoding RNAs for liver cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 181-93.
- [35] ZHANG H, HUANG X, LIU J, et al. Simultaneous and ultrasensitive detection of multiple microRNAs by single-molecule fluorescence imaging [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(15): 3812-9.
- [36] LINDEMANN J, YAN I K, PATEL T. Detection of circulating RNA using nanopore sequencing [M]. New York: Humana, 2021, doi:10.1007/978-1-0716-1581-2\_19.
- [37] YAO Y, ZHANG H, TIAN T, et al. Iodide-modified Ag nanoparticles coupled with DSN-assisted cycling amplification for label-free and ultrasensitive SERS detection of MicroRNA-21 [J]. *Talanta*, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122728.