

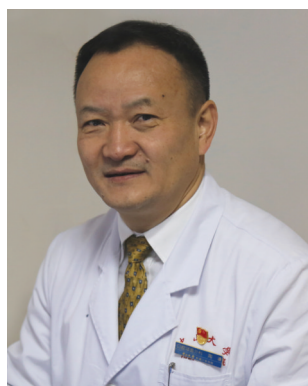
[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.04.002

· 专家论坛 ·

唾液转录组学与口腔癌标志物

陶谦, 刘鑫

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面头颈肿瘤外科, 广东省口腔医学重点实验室, 广东 广州 (510055)



【通信作者简介】 陶谦, 医学博士, 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面外科教授, 博士生导师, 主任医师。擅长口腔颌面部肿瘤、外伤和唾液腺相关疾病的诊断与治疗。主持和参加国家自然科学基金及省、市科研基金等研究工作。现任广东省口腔医学会口腔颌面外科专业委员会常委,《中华口腔医学研究杂志》(电子版)、《口腔疾病防治》杂志编委。主编专著《颌骨肿瘤的诊断与治疗》,在SCI杂志和国内专业杂志发表学术论文40余篇。

【摘要】 唾液中有丰富的DNA、RNA、蛋白质、微生物及代谢产物,蕴含着与血液相似的反映机体生理病理状态的巨大生物学信息,且唾液具有取材方便无创、携带安全、储存运输成本低等优势,可望作为理想的血液替代品用于疾病的筛查,近年来受到学者的广泛关注。随着微阵列技术、全基因组测序、全转录组测序等高通量技术的快速发展,已有多种疾病特异性唾液标志物被挖掘。唾液组学中的转录组学是连接基因组学和蛋白质组学的“桥梁”,是一门在整体水平上研究所有基因转录及转录调控规律的学科,不仅可在特定的时间和空间上研究唾液中的RNA成分变化,而且可揭示不同生物学进程及疾病发生发展过程的分子机制和调控网络。因此,唾液转录组检测作为一种高效精准的手段在疾病的早期筛查、预后评估等方面显示出巨大潜力。本文主要阐述唾液转录组学的研究进展,从检测技术、临床应用两个层面概括其在口腔癌领域的研究现状,并对其发展前景与面临的挑战进行述评。

【关键词】 唾液; 生物标志物; 转录组学; 口腔癌; 早期诊断

【中图分类号】 R781 【文献标识码】 A 【文章编号】 2096-1456(2018)04-0211-07

【引用著录格式】 陶谦, 刘鑫. 唾液转录组学与口腔癌标志物[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(4): 211-217.

Salivary transcriptomics and biomarkers of oral squamous cell carcinoma TAO Qian, LIU Xin. 1. Department of Oral Maxillofacial-Head and Neck Oncology, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: TAO Qian, Email: taoqian@mail.sysu.edu.cn, Tel: 0086-20-83846030

【Abstract】 Saliva is rich in DNA, RNA, proteins, microorganisms and metabolites, containing large amounts of bio-information, similar to blood, and reflecting the physiological or pathological state of the whole body. Additionally, with its advantages of non-invasive collection methods, safe transport and low transportation cost, saliva has attracted extensive attention of scholars recently as a potential substitute for blood. With the rapid development of high-throughput techniques such as microarray technology, whole genome sequencing and whole transcriptome sequencing, a variety of

【收稿日期】 2017-08-02; 【修回日期】 2017-12-01

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81072227); 广东省自然科学基金项目(2014A030313153); 广州市科技计划项目(2015100110268)

【通信作者】 陶谦, 主任医师, 博士, Email: taoqian@mail.sysu.edu.cn

disease-specific salivary biomarkers have been discovered. Salivary transcriptomics, a bridge connecting genomics and proteomics, provides a comprehensive understanding of gene transcription, RNA composition and interactions. This methodology not only allows the investigation of salivary components with temporal and spatial specificity but also reveals regulatory networks during disease development, with high potential for the early screening and assessment of diseases. Here, we outline the development of salivary transcriptomics, highlight its current research status in oral cancer from two aspects of technological and clinical applications, and further address prospects and challenges of the near future.

【Key words】 Saliva; Biomarker; Transcriptomics; Oral cancer; Early diagnosis

人类唾液成分复杂,主要成分是水(约占99%),其次富含DNA、RNA、蛋白质、微生物及代谢产物等。与血液相似,唾液中同样蕴含大量能反映全身健康状况的生物信息,且唾液收集具有简单无创、携带安全、储存运输成本低等优势^[1-3],因此,唾液可望作为理想的血液替代品用于疾病的筛查。随着生命科学研究的不断发展,微阵列技术和全基因组测序、全转录组测序等高通量、高敏感性技术已广泛用于唾液生物标志物的研究^[4]。唾液组学在快速获得和筛选生物标志物、临床诊断治疗疾病及疗效监测等方面发挥着极其重要的作用,主要涵盖唾液基因组学、转录组学、蛋白质组学、微生物组学、代谢组学等领域^[5]。近年来,以唾液转录组学的发展最为迅速,微生物组学和代谢组学研究也方兴未艾。现就唾液组学研究进展及唾液转录组学在口腔癌中的临床应用价值作一阐述。

1 唾液组学与口腔癌

唾液基因组主要包含人类DNA,来自口腔粘膜细胞,约占70%,此外还有口腔微生物和病毒DNA。Abraham^[6]和Looi等^[7]将唾液DNA和血浆DNA进行对比,发现唾液DNA在260 nm和280 nm下吸光度比值为1.56,纯度与血浆DNA相近,且性质稳定,不易降解,基因分型与血浆高度一致。尽管唾液中DNA含量(约为12 μg/mL)不足血浆DNA的50%(约为26 μg/mL),但已足够用于基因分型、DNA测序及PCR等检测。学者前期研究发现血浆游离循环肿瘤DNA(cell-free circulating tumor DNA, ctDNA)的基因突变图谱、启动子甲基化水平变化、微卫星变化等与原发肿瘤高度一致,被认为是极有潜力的肿瘤早期筛查与疗效评估手段^[8]。近年来,唾液中DNA表达谱变化也被报道与肿瘤发生发展密切相关。Liao等^[9]报道,62.5%

的口腔癌患者唾液DNA中p53基因4号外显子第63位密码子发生突变,p53基因是关键性的抑癌基因,大约50%的恶性肿瘤与p53基因的突变相关。Carvalho等^[10]分析了61例头颈癌患者唾液中TIMP3、MGMT、MINT31、CyA1、DCC、DAPK和p16等抑癌基因甲基化水平,发现54.1%的标本出现了至少一个基因启动子甲基化。

蛋白质组学从整体角度分析细胞、组织及生物体内动态变化的蛋白质成分、表达水平与修饰状态,以揭示蛋白质功能及相互作用规律。唾液中共鉴定出1 166种蛋白质,其中914种由腮腺分泌,917种来自颌下腺和舌下腺,约有57%的蛋白由3个腺体共同分泌^[11]。唾液蛋白质含量约为0.5~3 g/L,仅相当于血液中的30%左右^[12],但其表达水平的变化仍可在很大程度上反映疾病状态,在疾病筛查、疗效评估上发挥极其重要的作用^[5,12]。比如在口腔癌患者唾液中已发现MMP-1、MMP-3和MMP-9等蛋白酶和IL-1α、IL-6、VEGF-A、TNF-α和IL-1RA等细胞因子表达显著上调^[13-14],其中IL-1RA和TNF-α已被证实在低分化鳞癌患者唾液中上调更为显著,可作为评判预后的指标^[15-16]。近年来,高效液相色谱联合质谱对唾液蛋白组分进行分析,可大大提高蛋白质的鉴定效能。Sivadasan等^[17]使用液相色谱联串质谱技术,从口腔癌患者唾液中筛选出292种潜在的生物标志物,分析效能明显高于传统技术。

唾液代谢组学主要对唾液中相对分子质量小于1 000的中间代谢产物、激素、其他信号分子及二级代谢产物等进行定性和定量分析,以弄清疾病特征性代谢产物,了解其发生原因及代谢途径,在肿瘤及口腔感染性疾病的评估上均具有一定潜力。Sugimoto等^[18]利用毛细管电泳飞行时间质谱分析法对口腔癌、乳腺癌、胰腺癌患者和健康对照组的唾液代谢组进行分析,发现唾液中存在众多

反映疾病代谢水平的特异性产物。口腔癌患者唾液中鉴定出包括吡咯啉、胆碱和缬氨酸在内的28种与对照组存在差异的代谢产物,受试者工作特征曲线下面积为0.865,具有一定的可靠性。近期研究发现,98种代谢产物在口腔癌患者唾液中水平高于对照组,以S-腺苷甲硫氨酸和甲基哌啶差异最为显著,可望用于口腔癌诊断^[19]。

微生物组学主要通过DNA杂交、16S rRNA测序和宏基因组测序等技术对样本中所有微生物种类、丰度以及微生物群体代谢潜能进行评估,从宏观角度观察微生物群落与疾病之间的关系。曾有学者采用DNA杂交技术检测了口腔癌患者唾液中40种常见细菌,发现牙龈卟啉单胞菌、产黑色素普氏菌和轻链球菌水平显著上调,对口腔癌的早期筛查有一定帮助^[20]。

2 唾液转录组学与口腔癌标志物

转录组学在整体水平上研究某细胞在某时刻的全部基因转录本种类、结构和功能及转录调控规律。狭义转录组指可翻译蛋白质的mRNA总和,广义转录组指从一种组织或基因组转录的RNA总和,包括编码蛋白质的mRNA和各种非编码RNA(包括rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA、miRNA等)。研究技术主要有基于分子杂交技术的微阵列技术和基于测序技术的转录组测序技术,包括表达序列标签技术、基因表达系列分析技术、大规模平行测序技术以及RNA测序技术。在肿瘤分子生物学研究领域,运用转录组学技术分析恶性肿瘤的转录组信息,认识恶性肿瘤的基因表达调控规律,构建分子调控网络,已成为当前生物医学领域备受关注的前沿热点。比如在胰腺癌^[21]、肺癌^[22]、乳腺癌^[23]等多种恶性肿瘤患者的血液、尿液、组织标本中均已发现各自的特异性RNA标志物。迄今为止,唾液中已检测出多于3000种mRNA和300种miRNA^[24],另外还有一些不参与编码蛋白的RNA分子,如piRNA、circRNA、LncRNA等,唾液中丰度比血清和脑脊液高^[25],且性质稳定,能在较长时间内稳定存在于唾液中,正吸引众多学者在转录组水平研究疾病的发生发展机制。

2.1 唾液mRNA与口腔癌标志物

mRNA性质极不稳定,可能在数分钟内完全降解,早先认为mRNA无法稳定存在于离体组织、血液、唾液等标本中。随着检测手段不断完善,组织、血液中的mRNA相继被成功提取和鉴定,唾液

中mRNA的分离鉴定也备受关注。Li等^[26-27]于2004年首次在唾液中检测到稳定的mRNA,可用于PCR、微阵列、高通量测序等检测;进一步收集32例T1/T2期口腔癌患者和32例正常人非刺激性唾液,利用人类全基因组表达谱芯片u133A对唾液上清转录组进行分析,筛选出1679个差异表达的基因转录本;经qPCR验证,发现IL-8高度上调,H3F3A、IL-1 β 和S100P中度上调,DUSP1、OAZ1和SAT低度上调,IL-1 β 、OAZ1、SAT1、IL-8组合用于诊断口腔癌的灵敏度和特异度均达0.91。另外,将转录组和蛋白标志物结合也可较大程度提高口腔癌诊断效能。Brinkmann等^[28]报道L1B蛋白+SAT1mRNA+DUSP1mRNA用于诊断口腔癌的灵敏度和特异度分别为89%和78%,IL-1 β mRNA+SAT1mRNA+DUSP1mRNA可用于口腔癌早期筛查,IL-1 β 蛋白+DUSP1mRNA可作为晚期口腔癌评判指标。

2.2 唾液microRNA与口腔癌标志物

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度为19~24个核苷酸的高度保守的非编码单链RNA,一个miRNA可靶向调控多个mRNA,通过完全或不完全结合靶基因mRNA的3'区,在转录后水平抑制或阻断靶基因表达。与DNA和mRNA相比,miRNA具有更强的时间和空间特异性,可更精确地反映疾病发生发展的过程。miRNA与肿瘤关系的研究起始于2002年,Calin等^[29]报道慢性粒细胞性白血病患者miR-15和miR-16缺失或下调,进一步研究证实miR-15/miR-16能负向调控癌基因Bcl-2表达,该发现使miRNA作为潜在的肿瘤标志物受到空前广泛的关注。在随后10来年中,已有大量肿瘤特异性miRNA被筛选和鉴定,例如,miR-21、miR-155等已被证实在乳腺癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤组织中表达上调^[30-35],是研究最广泛的促癌miRNAs。又如let-7家族、miR-145等,在肺癌、乳腺癌、卵巢癌等组织中表达显著下调^[36-39],是目前研究最为透彻的抑癌miRNA。然而由于miRNA调控网络极其复杂,样本例数不同及样本个体差异,缺乏标准化操作流程等原因,导致该领域研究可重复性不理想,不同研究者往往很难得到一致的结果,其可靠性也有待验证。近年来,唾液miRNA因性质稳定、取材方便而备受关注^[40]。

Park等^[24]通过检测12例口腔癌患者和12例健康对照组唾液中300多个miRNA的表达水平,发现

miR-200a、miR-125a、miR-142-3p、miR-93在两组间差异表达。qPCR检测证实在口腔癌患者唾液中仅有miR-125a和miR-200a显著下调,ROC曲线下面积分别为0.65和0.62,敏感性及特异性均不理想。Wiklund等^[41]也做了类似研究,并未证实miR-200a表达量与对照组存在显著差异,却发现miR-375在口腔癌患者唾液中下调显著,可用于口腔癌的早期筛查。

在不同的肿瘤中,miRNA可能因为靶向不同的目的基因而发挥不同甚至相反的作用,充分体现了miRNA调控网络的复杂性和研究的挑战性。近年来,有大量文献^[42-44]报道miR-31在胃癌、膀胱癌、胰腺癌和黑色素瘤等恶性肿瘤中表达下调,其可能通过抑制RhoA、Fzd3、ITGA5、M-RIP、MMP16、RDX等转移促进基因表达,抑制肿瘤进展。有趣的是,Liu等^[45-46]却发现在口腔癌发展的各个阶段,肿瘤组织、血浆和唾液miR-31均呈过表达,其表达量随肿瘤的切除而显著下调,在口腔癌中发挥肿瘤促进作用,且唾液miR-31丰度较血浆高,用于口腔癌的筛查和疗效评估具有更高的敏感性。

白斑、红斑、扁平苔藓等口腔潜在恶性病变(oral potential malignant disorders, OPMD)具有一定癌变潜能,且癌变发生在口腔癌进展的早期,因此,寻找反映OPMD癌变风险的标志物对口腔癌的早期筛查具有重要意义。Zahran等^[47]通过分析OPMD、口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)、复发性阿弗他溃疡患者和正常对照组唾液miRNA表达谱,发现OSCC组和OPMD组miRNA-21和miRNA-184表达显著上调,miRNA-145显著下调,建议将miR-21上调4倍、miR-184上调3倍和miR-145下调0.6作为评判OPMD癌变的标准。国内学者分析了癌变白斑患者唾液miRNA表达谱,发现与未癌变白斑患者相比,唾液miR-429过表达,miR-181、miR-144、miR-521、miR-339低表达^[48],因未做敏感性及特异性分析,以上指标能否帮助口腔癌早期诊断仍有待验证。

此外,唾液中还有一些miRNA表达水平变化被报道与口腔癌有关。Momen-Heravi等^[49]报道,miRNA-136和miR-27b在口腔癌患者唾液中呈低表达,用于口腔癌诊断的特异性达100%,灵敏度也高于85%。Salazar等^[50]发现口腔癌患者唾液miR-191、miR-9表达显著上调,miR-134显著下调,以上结果与TCGA数据库肿瘤组织测序结果高度一致,其中miR-9和miR-134的ROC曲线下面积分别

为0.85和0.98,有望成为头颈癌早期诊断的唾液标志物。尽管现阶段唾液miRNA与肿瘤关系的研究相对成熟,但仍需对现有标志物的灵敏度及特异性进行验证,进一步实现从实验室到临床的转化。

2.3 唾液LncRNA与口腔癌标志物

长链非编码RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)是一类位于细胞核或细胞质内,长度大于200个核苷酸的非编码RNA,具有时间与空间特异性,可在多层面(表观遗传学、选择性剪接和调控mRNA降解等)调控基因的表达,在肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、转移等过程中发挥重要作用^[51]。LncRNA在起初被认为在基因表达过程中不发挥任何生物学功能而未受到足够重视^[52]。2007年,Rinn等^[53]对LncRNA HOTAIR(HOX transcript antisense RNA)的功能进行了详细解读,认为其在基因转录和表达中发挥极其重要的调控作用,至此,LncRNA才作为一个新兴领域开始受到学者关注。芯片技术和高通量测序技术的推广极大程度推动了LncRNA研究进展,近几年更是爆发了该领域研究热潮,大量LncRNA的鉴定和功能解析帮助人们从基因表达调控网络的角度进一步认识复杂的生命过程。美国斯坦福大学的研究人员在2012年通过高通量RNA-seq技术完成了首个大型恶性肿瘤相关LncRNA表达谱分析,在64个恶性肿瘤类型之间找到1 065个差异表达的LncRNA^[54]。随后,学者又在血液、尿液和唾液等标本中发现了多种肿瘤特异性LncRNA^[55-59]。

唾液LncRNA与口腔癌关系的研究仍处于初期阶段,尚无突破性的研究成果,对其调控机制也未进行深入的探讨,目前相关领域仅检索到一篇文献。Tang等^[58]选择了6个已证实与肿瘤密切相关的LncRNA(MALAT-1、HULC、HOTAIR、NEAT-1、MEG-3和UCA1)为目标分子,通过分析9位口腔癌患者肿瘤组织、癌旁组织和唾液中目标LncRNA表达水平,发现口腔癌患者肿瘤组织HOTAIR、NRAT-1和UCA1表达上调,MEG-3下调,上述变化在伴淋巴结转移患者肿瘤组织中更为显著。唾液检测仅有5位患者唾液MALAT-1上调,其中3位伴淋巴结转移。提示MALAT-1在一定程度上反映口腔癌患者淋巴结转移情况,但唾液MALAT-1能否作为判断口腔癌淋巴结转移、评估预后的指标仍需后续实验进行验证。

转录组学是后基因组时代率先发展起来且应用最广的学科,是连接基因组学和蛋白质组学的

“纽带”。唾液转录组学在近年来迅速崛起,在 RNA 芯片和 RNA 测序等高通量技术支持下,已有大量口腔癌相关唾液 RNA 标志物被筛选和鉴定(具体数据见表 1)。但该领域研究尚处于早期阶段,仍面临诸多问题与挑战,如缺乏唾液样本采集、处理及保存的标准化操作流程,标志物敏感性及特异性有待验证,LncRNA、circRNA 等最新 RNA 领域研究相对空白,尚无可单独用于口腔癌诊断的唾液指标等。因此,未来应以 LncRNA 为突破口,完善操作规程,挖掘更多高灵敏度和特异性的唾液标志物,实现口腔癌早期诊断、评估和治疗。

表 1 口腔癌相关唾液 RNA 标志物
Table 1 OSCC-related salivary RNA biomarkers

作者	年份	RNA 类型	样本例数 (实验组/对照组)	唾液收集	检测方法	标志物	灵敏度(%) / 特异度(%) / AUC
Li 等 ^[26]	2004	mRNA	64(32/32)	非刺激相	人类全基因组表达谱芯片 u133A、qRT-PCR	IL8、IL1β、DUSP1、OAZ1、SAT1、H3F3A、S100P	DUSP1(59 /75/0.65) H3F3A(53 /81/0.68) IL1β(63/72/0.70) IL8(88/ 81/ 0.85) OAZ1(100/38/0.69) S100P(72 /63 /0.71) SATB(81/ 56/0.70) IL1β+OAZ1+SAT+IL8. (91/91/0.95)
Brinkmann 等 ^[28]	2010	mRNA、蛋白	86(35/51)	非刺激相	qPCR、ELISA	DUSP1、IL8、IL1β、OAZ1、SAT1、S100P(mRNA) IL1β、IL8、M2BP(蛋白)	IL1β 蛋白+ SAT1 mRNA + DUSP1 mRNA(89/78/0.86) IL1βmRNA + SAT1 mRNA + DUSP1 mRNA(诊断 T1/T2 期 OSCC:67/96/0.85) IL1β 蛋白 + DUSP1 mRNA(诊断 T3/T4 期 OSCC:82/84/ 0.88)
Park 等 ^[24]	2009	miRNA	24(12/12)	NR	逆转录酶-预扩增定量 PCR	miR-200a、miR-125a	miR-200a(NR/NR/0.62) miR-125a(NR/NR/0.65)
Wiklund, 等 ^[41]	2011	miRNA	33(25/8)	非刺激相	qRT-PCR	miR-375	NR
Liu 等 ^[46]	2012	miRNA	79(45/34)	NR	qRT-PCR	miR-31	80/68/0.82
Momen-Heravi 等 ^[49]	2014	miRNA	34(9/25)	非刺激相	miRNA 微阵列	miR-136、miR-27b	miR-136(88/100/0.96) miR-27b(85/100/0.96)
Salazar 等 ^[50]	2014	miRNA	112(56/56)	非刺激相	miRNA 微阵列、qPCR	miR-191、miR-9、miR-134	miR - 191 (NR/NR/0.74)、miR - 9 (NR/NR/0.85)、miR-134(NR/NR/0.98)
李月秀 等 ^[48]	2015	miRNA	60(20/40)	非刺激相	qPCR	miR-429、miR-181、miR-144、miR-521、miR-339	NR
Zahran 等 ^[47]	2015	miRNA	100(20/80)	非刺激相	qRT-PCR	miRNA-21、miRNA-184、miRNA-145	miRNA-21(65/65/NR) miRNA-184(80/75/NR) miRNA-145(70/60/NR)
Tang 等 ^[58]	2013	LncRNA	18(9/9)	NR	qRT-PCR	MALAT-1	NR

NR: not reported.

参考文献

[1] Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(4): 781-791.

[2] Radhika T, Jeddy N, Nithya S, et al. Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma - an insight[J]. J Oral Biol Craniofac

- Res, 2016, 6(Suppl 1): S51-S54.
- [3] Castagnola M, Scarano E, Passali GC, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities[J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2017, 37(2): 94-101.
 - [4] Xiao H, Zhang L, Zhou H, et al. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(2).
 - [5] Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives[J]. *Oral Dis*, 2011, 17(4): 345-354.
 - [6] Abraham JE, Maranian MJ, Spiteri I, et al. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping[J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5(1): 19.
 - [7] Looi ML, Zakaria H, Osman J, et al. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(3/4): 307-312.
 - [8] Gold B, Cankovic M, Furtado LV, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility?: a report of the association for molecular pathology[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 209-224.
 - [9] Liao PH, Chang YC, Huang MF, et al. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(3): 272-276.
 - [10] Carvalho AL, Henrique R, Jeronimo C, et al. Detection of promoter hypermethylation in salivary rinses as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma surveillance[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(14): 4782-4789.
 - [11] Denny P, Hagen FK, Hardt M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(5): 1994-2006.
 - [12] Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease[J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(1): 1-9.
 - [13] Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(7): 1194-1198.
 - [14] Stott-Miller M, Houck JR, Lohavanichbutr P, et al. Tumor and salivary matrix metalloproteinase levels are strong diagnostic markers of oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(12): 2628-2636.
 - [15] Korostoff A, Reder L, Masood R, et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(4): 282-287.
 - [16] Aziz S, Ahmed SS, Ali A, et al. Salivary immunosuppressive cytokines IL-10 and IL-13 are significantly elevated in oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(7): 318-328.
 - [17] Sivadasan P, Gupta MK, Sathe GJ, et al. Human salivary proteome - a resource of potential biomarkers for oral cancer[J]. *J Proteomics*, 2015, 127(Pt A): 89-95.
 - [18] Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles[J]. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 78-95.
 - [19] Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31520.
 - [20] Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects[J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1): 27.
 - [21] Lau C, Kim Y, Chia D, et al. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26888-26897.
 - [22] Zhang L, Xiao H, Zhou H, et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(19): 3341-3350.
 - [23] Dobroff AS, D'angelo S, Eckhardt BL, et al. Towards a transcriptome-based theranostic platform for unfavorable breast cancer phenotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(45).
 - [24] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5473-5477.
 - [25] Fonteles CS, Dos Santos CF, Da Silva Alves KS, et al. Comparative proteomic analysis of human whole saliva of children with protein-energy undernutrition[J]. *Nutrition*, 2012, 28(7/8): 744-748.
 - [26] Li Y, St John MA, Zhou X, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8442-8450.
 - [27] Li Y, Zhou X, St John MA, et al. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology[J]. *J Dent Res*, 2004, 83(3): 199-203.
 - [28] Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic MV, et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(1): 51-55.
 - [29] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(24): 15524-15529.
 - [30] Karimi Kurdistan Z, Saberi S, Tsai KW, et al. MicroRNA - 21: mechanisms of oncogenesis and its application in diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. *Arch Iran Med*, 2015, 18(8): 524-536.
 - [31] Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer[J]. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1122-1143.
 - [32] Steele CW, Oien KA, McKay CJ, et al. Clinical potential of microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Pancreas*, 2011, 40(8): 1165-1171.
 - [33] Markou A, Zavridou M, Lianidou ES. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer[J]. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, 2016, 7: 19-27.
 - [34] Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, et al. MicroRNAs: potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 901-913.
 - [35] Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, et al. MicroRNAs as cancer therapeutics: a step closer to clinical application[J]. *Cancer Lett*,

- 2017, 407: 113-122.
- [36] Yang G, Zhang W, Yu C, et al. MicroRNA let-7: Regulation, single nucleotide polymorphism, and therapy in lung cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(Suppl 1): C1-C6.
- [37] Barh D, Malhotra R, Ravi B, et al. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic[J]. Curr Oncol, 2010, 17(1): 70-80.
- [38] Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, et al. The role of microRNAs in ovarian cancer [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(8):249393.
- [39] Li Y, Li Y, Liu J, et al. Expression levels of microRNA -145 and microRNA -10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(3): 272-279.
- [40] Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids[J]. Clin Chem, 2010, 56(11): 1733-1741.
- [41] Wiklund ED, Gao S, Hulf T, et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27840.
- [42] Greenberg E, Hershkovitz L, Itzhaki O, et al. Regulation of cancer aggressive features in melanoma cells by microRNAs[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18936.
- [43] Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA, et al. A microRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype [J]. Urol Oncol, 2011, 29(6): 794-801.
- [44] Wu XM, Shao XQ, Meng XX, et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin-resistant gastric cancer cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(2): 259-269.
- [45] Liu CJ, Kao SY, Tu HF, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer[J]. Oral Dis, 2010, 16(4): 360-364.
- [46] Liu CJ, Lin SC, Yang CC, et al. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 2012, 34(2): 219-224.
- [47] Zahran F, Ghalwash D, Shaker O, et al. Salivary microRNAs in oral cancer[J]. Oral Dis, 2015, 21(6): 739-747.
- [48] 李月秀, 杨娅, 肖长杰, 等. 目标 miRNAs 在口腔白斑癌变患者唾液中的表达研究 [J]. 临床口腔医学杂志, 2015,(7): 407-409.
- [49] Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP, et al. Genomewide study of salivary microRNAs for detection of oral cancer[J]. J Dent Res, 2014, 93(7 Suppl): 86S-93S.
- [50] Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers[J]. Cell Oncol, 2014, 37(5): 331-338.
- [51] Qi P, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic Gold mine[J]. Modern Pathology, 2013, 26(2): 155-165.
- [52] 欧阳可雄, 梁军, 邹瑞, 等. 舌鳞癌组织长链非编码 RNA 的 Ion Torrent 高通量检测和分析[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(1): 15-19.
- [53] Rinn JL, Kertes M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7): 1311-1323.
- [54] Brunner AL, Beck AH, Edris B, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers[J]. Genome Biol, 2012, 13(8): R75.
- [55] Reis EM, Nakaya HI, Louro R, et al. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(39): 6684-6692.
- [56] Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer?[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(R2): R152-R161.
- [57] Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas[J]. Mol Cancer, 2011, 10(1): 10.
- [58] Tang H, Wu Z, Zhang J, et al. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3): 761-766.
- [59] Ronnau C, Verhaegh GW, Luna - Velez MV, et al. Noncoding RNAs as novel biomarkers in prostate cancer[J]. Biomed Res Int, 2014: 591703.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)