长链非编码 RNA HOTAIR 在胃癌组织中的表达及其与预后相关性

王凤琴[1],李洋[2],罗艳丽[1],徐秋兰[1]
(1.沈阳市第二中医医院消化内科,辽宁 沈阳 110101;2.辽宁中医药大学附属一院,辽宁 沈阳 110101)

摘要:目的 探讨胃癌中长链非编码 RNA HOTAIR 的表达及意义。**方法** 收集手术切除的胃癌及癌旁正常组织标本 60 例,采用逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 HOTAIR 在胃癌组织与癌旁正常组织中的 mRNA 表达水平,并利用 Kaplan Meier-plotter数据库分析其与病人预后的相关性。**结果** 胃癌组织中 HOTAIR 的表达水平为(4.26±1.47)明显高于癌旁组织表达(0.47±0.35),差异有统计学意义($P<0.001$);HOTAIR 高表达组病人的预后不良。**结论** HOTAIR 在胃癌中呈高表达并与胃癌病人的预后呈负相关关系。

关键词:胃肿瘤;长链非编码 RNA;HOTAIR;预后
doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.03.021

Long non-coding RNA HOTAIR expression profile in gastric cancer and its relationship between patient prognosis

WANG Fengqing[1],LI Yang[2],LUO Yanli[1],XU Qiulan[1]
(1. *The Second Chinese Medicine Hospital in Shenyang,Shenyang,Liaoning* 110101,*China*;
2. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital,Shenyang,Liaoning* 110101,*China*)

Abstract:Objective To study the expression and clinical significances of long non-coding RNA HOTAIR in gastric cancer. **Methods** A total of 60 patients with gastric cancer who were surgically resected specimens of gastric cancer and adjacent tissues in gastric cancer tissues,evaluate the mRNA expression of HOTAIR by RT-qPCR,and further analyze the relationship between the mRNA expression of HOTAIR and patient prognosis by Meier-plotter database. **Results** HOTAIR expression level (4.26±1.47) was significantly higher ($P<0.001$) than adjacent tissues in gastric cancer tissues (0.47±0.35). High HOTAIR expression level group of patients has poor prognosis. **Conclusions** The expression level of HOTAIR in gastric cancer is significantly higher than the normal adjacent tissues and its expression level is closely related to the patient's prognosis.

Key words: Stomach neoplasms;Long non-coding RNA;HOTAIR;Prognosis

胃癌(Gastric cancer)发病率占我国消化道肿瘤第一位,死亡人数接近全部肿瘤死亡人数的25%,其来源于胃黏膜上皮细胞的恶变,严重影响人类健康[1]。在基因组中除了能够翻译产生蛋白质的 RNA 外,还普遍存在一类无开放阅读框的 RNA,称为非编码 RNA(Non-coding RNAs,ncRNA),其中超过200 nt 为长链非编码 RNA(Long non-coding RNAs,LncRNA)[2]。研究发现,LncRNA 广泛参与人类疾病特别是恶性肿瘤的发生发展过程,这说明 LncRNA 可以作为潜在的肿瘤治疗靶点[3]。HOTAIR编码序列长度约为

[14] 张方毅,翁志梁,陈盛烨,等.后腹腔镜嗜铬细胞瘤切除术与开放手术的初步探讨[J].温州医学院学报,2006,36(5):471-473. DOI:10.3969/j.issn.1000-2138.2006.05.020.
[15] 张绍崎,蔡维奇.后腹腔镜手术治疗肾上腺嗜铬细胞瘤的临床评价[J].现代泌尿外科杂志,2011,16(4):343-345. DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2011.04.021.
[16] 赵林飞,邱瑞香,张翠莲,等.腹膜后腹腔镜肾上腺嗜铬细胞瘤切除术与开放手术患者血压变化的对比研究[J].腹腔镜外科杂志,2011,16(4):308-310. DOI:10.3969/j.issn.1009-6612.2011.04.028.
[17] GAGNER M,LACROIX A,BOLTE E. Laparoscopic adrenalectomy in Cushings syndrome and pheochromocytoma [J]. New Engl J Med,1992,327(14):1033.
[18] 郑士平,王志勇,袁荫田,等.腹膜后腹腔镜手术治疗肾上腺嗜铬细胞瘤16例报告[J].腹腔镜外科杂志,2010,15(2):99-100.
[19] SMITH CD,WEBER CJ,AMERSON R,et al. Laparoscopic adrenalectomy:new glod standard [J]. World J Surg,1999,23(4):389-396.
[20] 蔡庆凯,田博宇,宋祥伟,等.后腹腔镜下肾上腺肿瘤切除74例临床体会[J].中国医药导报,2009,6(5):156,160. DOI:10.3969/j.issn.1673-7210.2009.15.105.
[21] 陈春延.腹腔镜技术治疗肾上腺嗜铬细胞瘤的进展[J].广西医学,2009,31(8):1179-1182. DOI:10.3969/j.issn.0253-4304.2009.08.067.
[22] 张国庆,亓林,陈运,等.传统2D腹腔镜与3D腹腔镜手术治疗肾上腺瘤的疗效比较[J].安徽医药,2015,19(7):1334-1336. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2015.07.032.

(收稿日期:2016-07-12,修回日期:2017-02-10)

2.2 kb,位于基因组 12q13 上 HOXC 位点,其可通过反式调控下游基因表达[4]。HOTAIR 在多种肿瘤如胰腺癌、膀胱癌、鼻咽癌、肺癌、前列腺癌等中表达异常升高说明其参与了肿瘤的发生发展[5-10]。根据不同消化道恶性肿瘤的死亡率进行统计后发现,胃癌居于死亡率前列,许多病人经过传统的手术及放化疗治疗后仍出现疾病进展或复发,因此新的治疗手段的开发对胃癌的诊断和治疗起到非常重要的作用[11]。本研究通过逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)的方法对胃癌与癌旁组织中 HOTAIR 的表达水平进行检测,并利用 Kaplan Meier-plotter 数据库初步分析其表达水平与胃癌病人的预后相关性进行分析,以期为胃癌病人的分子诊断、靶向治疗及预后预测提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 45 例胃癌及癌旁组织取自 2013—2016 年就诊于辽宁省沈阳市第二中医医院的病人。经病理证实为胃癌的病人的病理标本作为胃癌组织,并取同一标本距癌组织边缘 >5 cm 且经 HE 染色证实无肿瘤细胞浸润、无明显细胞增生等病变的胃组织作为癌旁组织对照。其中男性 35 例,女性 10 例,年龄 31 ~84 岁,平均年龄(58.0 ±6.3)岁,中位年龄 58 岁;45 例中均无术前应用化疗药物或靶向药物进行辅助治疗,病理确诊依据参照 WHO 诊断标准。排除标准为:病人于术前接受过任何形式的放化疗或分子靶向治疗。手术切除后将标本转入液氮罐中保存,整个保存过程均参与无核酶试剂及耗材,抽提总 RNA 供 RT-qPCR 检测。参见表 1。

表 1 胃癌病人 45 例临床病理资料

临床病理特征	例数	百分比/%
性别		
男	35	77.8
女	10	22.2
TNM 分期		
Ⅰ期	5	11.1
Ⅱ期	3	6.7
Ⅲ期	12	26.7
Ⅳ期	25	55.6
分化程度		
高或中分化	28	62.2
低分化	17	37.8

1.2 试剂与仪器 NanoDrop2000 超微量分光光度计,Eppendorf PCR 仪,ABI 7500 Real-time PCR 仪。RNAiso Plus 及 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)购自 Takara 公司,Fast-Start Universal SYBR Green Master(ROX)购自 Roche 公司,HOTAIR 及 β-actin 引物购自生工生物工程有限公司,序列见表 2。

表 2 荧光定量引物表

引物名称	序列(5'-3')
β-actin(forward)	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
β-actin(reverse)	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
HOTAIR(forward)	CCAGAGAACGCTGGAAAAACCTG
HOTAIR(reverse)	GGAGATGATAAGAAGAGCAAGGAA

1.3 实验方法

1.3.1 临床组织样本中 LncRNA HOTAIR 表达水平检测 (1)Total RNA 提取:按照 RNAiso Plus 试剂的操作手册进行,从 -80 ℃冰箱中取出手术后的胃癌及癌旁组织各 100 mg,加液氮研磨至粉末状,RNAiso Plus 抽提 Total RNA,用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测其浓度及 OD260/OD280。(2)cDNA 反转录合成:按照逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)的说明书进行,逆转录 RNA 总量 1 μg,反应总体系 20 μL,将产物 cDNA 取出后,无核酶水稀释至 500 μL 后保存备用。(3)RT-qPCR 检测 lncRNA HOTAIR 的表达水平:反应总体系 20 μL,包括引物 5 μL,模版 5 μL,FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) 10 μL。反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 40 s, 40 cycles。每组样品均设 3 个重复。(4)HOTAIR mRNA 相对表达量为非正态分布资料, HOTAIR 的表达水平与临床病理特征的关系采用 Fisher's 确切检验。$P<0.001$ 为差异有统计学意义。

1.3.2 LncRNA HOTAIR 表达水平与病人预后相关性分析 利用 Kaplan Meier-plotter 胃癌数据库(http://kmplot.com/)中数据,分析低分化与中高分化胃癌中 LncRNA HOTAIR 表达水平与病人预后的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计分析软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验比较癌组织及癌旁组织 HOTAIR mRNA 表达水平的差异(检验水准 $\alpha=0.05$);χ^2 检验比较计数资料之间的差异(检验水准 $\alpha=0.05$),Kaplan Meier 生存分析法分析 HOTAIR的表达与病人预后的关系。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 LncRNA HOTAIR 在胃癌组织中的表达水平 在 45 例胃癌病例中,通过 RT-qPCR 检测癌及癌旁组织中 HOTAAIR 表达水平,结果显示癌组织中的 HOTAIR 表达为(4.26 ± 1.47)高于癌旁组织表达(0.47 ± 0.35),t 检验比较两者差异有统计学意义(P <0.001)(图 1)。

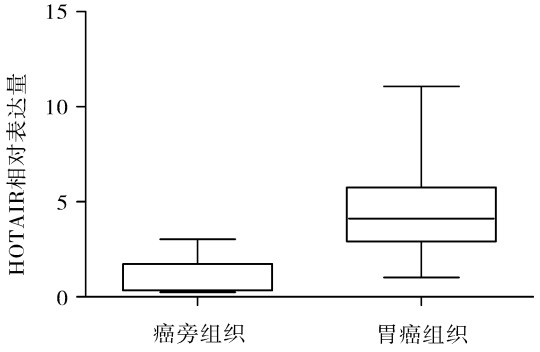

图 1 HOTAIR 在胃癌及对应正常癌旁组织中的表达水平

2.2 胃组织中 HOTAIR RNA 表达量与临床病理关系 根据胃癌组织中的 HOTAIR RNA 的平均表达量确定胃癌组织中 HOTAIR RNA 的高低表达情况。采用 χ^2 检验分析 HOTAIR RNA 表达情况与胃癌临床病理指标相关性。见表 3。

2.3 胃组织中 HOTAIR RNA 表达量与病人预后相关性分析 根据 Kaplan Meier-plotter 胃癌数据库中的 HOTAIR 表达水平及病人随访资料,根据 631 例病人 HOTAIR 表达水平分为高表达与低表达组。通过绘制生存分析曲线,发现 HOTAIR 高表达组病人与低表达组病人相比预后较差,差异有统计学意义(P <0.05),见图 2。

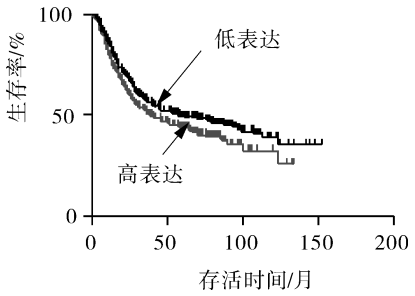

图 2 胃癌病人 HOTAIR 高低表达的生存曲线

3 讨论

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,在与癌症相关的死亡中胃癌占全球第二。胃癌起源于胃表面上皮细胞。胃的每个部位都有可能发生肿瘤,但胃窦和幽门恶性肿瘤的发病率最高[12]。胃癌的发生发展是一个复杂的过程,涉及多个因素的逐步发展其中也包含编码和非编码基因。因此,发掘胃癌的预测指标及治疗靶点是提高胃癌防治疗效的关键[13]。在人类基因组中,仅有不到 2% 的 mRNA 能够翻译成为蛋白质。有些基因虽然不参与蛋白质编码,但仍可以被转录成非编码 RNA[14]。研究发现 lncRNA 与人类多种疾病的发生,特别是与恶性肿瘤的发病发展密切相关[15]。在数量庞大的 LncRNA 家族中,HOTAIR 是一种典型的在肿瘤中起癌基因作用的 LncRNA。HOTAIR 由 HOXC 基因簇的反义链所编码,长度为 2158nt,由 6 个外显子所组成。其位于 12q13.13 染色体的 HoxC11 与 HoxC12 基因间[16-18]。研究证实,HOTAIR 在多种肿瘤中呈现异常高表达并且参与了肿瘤的发生发展

表 3 癌组织中 HOTAIR 表达量与临床病理参数的关系(n =45)

临床病理参数	例数	HOTAIR 表达情况/例(%)		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄				0.939	0.539
<65 岁	21	12(57.1)	9(42.9)		
≥65 岁	24	8(33.3)	16(66.7)		
性别				1.981	0.205
男	35	19(54.3)	16(45.7)		
女	10	6(60.0)	4(40.0)		
肿瘤大小				18.425	<0.01
<3 cm	29	21(72.4)	8(27.6)		
≥3 cm	16	6(37.5)	10(62.5)		
分化程度				12.213	<0.05
高或中分化	28	18(64.3)	10(35.7)		
低分化	17	5(29.4)	12(70.6)		

过程。Geng 等对 63 例肝癌组织样本检测 HOTAIR 的表达水平后发现,其在癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织,对随访资料统计后发现HOTAIR的表达与术后复发以及淋巴结转移相关[19]。Cai 等对 748 例病人资料进行生存曲线分析后发现,HOTAIR 表达水平较高的病人较较低的病人预后差[20]。有学者通过对 HOTAIR 在肿瘤细胞 EMT 过程中所起的作用研究后发现,HOTAIR 参与了肿瘤细胞干性的维持[21]。Li 等研究发现通过敲低 HOTAIR 的表达能够导致下游数百种基因表达水平的上升,进一步研究发现其能够通过与 PRC2 结合从而导致染色质重塑过程,HOTAIR 的高表达能够促进乳腺癌的发生发展[9]。

本研究对 HOTAIR 在胃癌组织中的表达水平进行了研究,结果表明 HOTAIR 的表达水平在癌组织相较癌旁组织中显著上升,这提示了我们HOTAIR可能在胃癌中作为一个癌基因在起作用。结合临床病理相关数据进行统计分析,发现胃癌组织中 HOTAIR 的表达量与胃癌肿瘤大小、分化程度密切相关,而与病人年龄、性别没有相关性。据此我们推测 HOTAIR 可能与胃癌的发生进展存在相关性。随后利用 Kaplan Meier-plotter 胃癌数据库分析了 HOTAIR 的表达水平与病人预后的相关性,结果显示 HOTAIR 表达水平与病人的预后呈负相关关系。以上结果提示我们HOTAIR的表达水平上升促进了胃癌的发生、发展与侵袭转移过程,其可以作为潜在的胃癌诊断分子标志物与治疗靶点,极具应用价值。

参考文献

[1] 李晨,范尧夫,刘皓,等. 长链非编码 RNA HOTAIR 对胃癌迁移和侵袭能力的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,36(14):2032-2034.

[2] WU Y,ZHANG L,WANG Y,et al. Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer[J]. Tumor Biology,2014,35(10):9531-9538. DOI:10.1007/s13277-014-2523-7.

[3] 杨峰,易凡,曹慧青,等. 长链非编码 RNA 研究进展[J]. 遗传,2014,36(5):456-468. DOI:10.3724/SPJ.1005.2014.0456.

[4] HAJJARI M,SALAVATY A. HOTAIR:an oncogenic long non-coding RNA in different cancers[J]. Cancer biology & medicine,2015,12(1):1-9. DOI:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0006.

[5] LI PF,CHEN SC,XIA T,et al. Non-coding RNAs and gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2014,20(18):5411-5419. DOI:10.3748/wjg.v20.i18.5411.

[6] LOEWEN G,JAYAWICKRAMARAJAH J,ZHUO Y,et al. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer[J]. J Hematol Oncol,2014,7(1):90. DOI:10.1186/s13045-014-0090-4.

[7] ONO H,MOTOI N,NAGANO H,et al. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation,invasiveness,and clinical relapse in small-cell lung cancer[J]. Cancer medicine,2014,3(3):632-642. DOI:10.1002/cam4.220.

[8] WANG R,SHI Y,CHEN L,et al. The ratio of FoxA1 to FoxA2 in lung adenocarcinoma is regulated by LncRNA HOTAIR and chromatin remodeling factor LSH[J]. Scientific reports,2015,5:17826. DOI:10.1038/srep17826.

[9] LI L,LIU B,WAPINSKI OL,et al. Targeted disruption of Hotair leads to homeotic transformation and gene derepression[J]. Cell reports,2013,5(1):3-12. DOI:10.1016/j.celrep.2013.09.003.

[10] CARRION K,DYO J,PATEL V,et al. The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/β-CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes[J]. PloS one,2014,9(5):e96577. DOI:10.1371/journal.pone.0096577.

[11] LI H,YU B,LI J,et al. Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer[J]. Oncotarget,2014,5(8):2318-2329. DOI:10.18632/oncotarget.1913.

[12] 夏李明,曾光,陈国忠,等. 七方胃痛颗粒对胃癌前病变 TFF1 基因 DNA 甲基化影响[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(21):2289-2291. DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.2014.21.003.

[13] MIN L,RUAN Y,SHEN Z,et al. Overexpression of Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1 correlates with poor prognosis in gastric cancer patients[J]. Histopathology,2015,67(5):677-688. DOI:10.1111/his.12695.

[14] 朱灵,李善高. 长链非编码 RNA 在胃肠道疾病中的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(3):245-248. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2015.03.002.

[15] 郭旗,梁启新,徐余兴,等. 长链非编码 RNA HOTAIR 在肝细胞癌中表达研究[J]. 肝胆外科杂志,2015,23(4):307-310.

[16] GUPTA RA,SHAH N,WANG KC,et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. Nature,2010,464(7291):1071-1076. DOI:10.1038/nature08975.

[17] YANG Z,ZHOU L,WU LM,et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation[J]. Annals of surgical oncology,2011,18(5):1243-1250. DOI:10.1245/s10434-011-1581-y.

[18] KOGO R,SHIMAMURA T,MIMORI K,et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers[J]. Cancer research,2011,71(20):6320-6326. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-1021.

[19] GENG YJ,XIE SL,LI Q,et al. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression[J]. Journal of International Medical Research,2011,39(6):2119-2128. DOI:10.1177/147323001103900608.

[20] CAI B,WU Z,LIAO K,et al. Long noncoding RNA HOTAIR can serve as a common molecular marker for lymph node metastasis:a meta-analysis[J]. Tumor Biology,2014,35(9):8445-8450. DOI:10.1007/s13277-014-2311-4.

[21] PÁDUA ALVES C,FPMSECA AS,MUYS BR,et al. Brief Report:The lincRNA Hotair Is Required for Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stemness Maintenance of Cancer Cell Lines[J]. Stem cells,2013,31(12):2827-2832. DOI:10.1002/stem.1547.

(收稿日期:2016-06-21,修回日期:2016-11-24)