

非小细胞肺癌血清中lncRNA HOTAIR的表达及临床意义

谭楠 李莉红 白璐 赵昆

【摘要】背景与目的 长链非编码RNA HOX转录反义RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR) 在多种肿瘤中异常表达。本研究旨在探讨非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者血清中lncRNA HOTAIR的水平及其临床意义。方法 采用实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法检测64例NSCLC患者和64例正常对照血清中HOTAIR的水平, 统计分析血清中HOTAIR的水平与NSCLC临床病理参数之间的关系。结果 与正常对照组相比, NSCLC患者血清中HOTAIR水平明显升高, 两组之间的差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。血清中HOTAIR水平与NSCLC患者的肿瘤大小、(tumor-node-metastasis, TNM) 分期及淋巴转移有关 ($P<0.05$), 而与患者的年龄、性别、吸烟、分化程度及病理类型均无明显相关 ($P>0.05$)。结论 NSCLC患者血清中HOTAIR水平明显升高, HOTAIR可能参与了NSCLC的发病过程。

【关键词】 肺肿瘤; 长链非编码RNA; HOX转录反义RNA; 临床病理

Expression of Serum LncRNA HOTAIR in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance

Nan TAN, Lihong LI, Lu BAI, Kun ZHAO

Cadre Ward, the First Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, China

Corresponding author: Nan TAN, E-mail: 479394158@qq.com

【Abstract】 **Background and objective** The expression of long noncoding RNA HOX antisense RNA (HOTAIR) is abnormal in a variety of tumors. The aim of this study is to explore the serum levels and clinical significance of HOTAIR in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The serum levels of HOTAIR were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) in 64 NSCLC patients and 64 normal controls. The relationships between the serum levels of HOTAIR and clinical pathological parameters were analyzed. **Results** Compared with normal controls, the serum levels of HOTAIR in patients with NSCLC increased significantly ($P<0.01$). The serum levels of HOTAIR were correlated with tumor size, tumor-node-metastasis (TNM) stage and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with age, gender, smoking, differentiation and histology ($P>0.05$). **Conclusion** The serum levels of HOTAIR in patients with NSCLC are significantly higher, and HOTAIR may be involved in the pathogenesis of NSCLC.

【Key words】 Lung neoplasms; Long noncoding RNA; HOX transcript antisense RNA; Clinical pathology

肺癌是起源于支气管粘膜或腺体的恶性肿瘤, 是发病率和死亡率增长最快、对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一, 根据统计肺癌的年发病人数及年死亡人数均居全球肿瘤首位^[1]。肺癌的发病机制尚未完全明确, 可能与吸烟、职业、环境接触、电离辐射、既往肺部慢性感染、遗传及大气污染等因素有关, 肺癌的早期症状不明显, 甚至可无任何不适, 因

此研究肺癌的发病机制及早期诊断对肺癌的治疗及预后至关重要。长链非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度超过200 nt的RNA分子, 它们并不编码蛋白, 而是在表观遗传、转录以及转录后等多种层面上调控基因的表达水平^[2,3], 研究证实lncRNA广泛参与了细胞增殖、分化及凋亡等过程, 在多种疾病病理过程中发挥重要作用^[4], 与肿瘤的疾病、转移、预后及治疗密切相关^[5,6]。HOX转录反义RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR) 是一种新近发现具有反式转录调控作用的lncRNA^[7], 国内

作者单位: 710002 西安, 西安市第一医院干部病房科 (通讯作者: 谭楠, E-mail: 479394158@qq.com)

外研究^[8-12]发现HOTAIR在肺癌组织中高表达,且与肺癌的临床分期、淋巴结转移及预后有关。为了进一步研究HOTAIR在肺癌诊断及预后中的作用,本实验采用实时定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血清中HOTAIR水平,并分析其与临床病理参数之间的关系。

1 资料与方法

1.1 病例资料 选取西安市第一医院2016年1月-2016年11月期间经过组织病理确诊的NSCLC患者64例,其中男性38例,女性26例,年龄32岁-75岁,平均(56.4±10.7)岁,组织病理类型为鳞癌23例、腺癌39例、大细胞癌2例,分期采用2009年国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)(第7版)肺癌肿瘤-淋巴结-转移(tumor-node-metastasis, TNM)分期标准进行:I期15例,II期20例,III期26例,IV期3例。64例健康体检者作为正常对照组,其中男性40例,女性24例,年龄26岁-71岁,平均(53.4±9.6)岁,本研究经过医院伦理委员会批准并征得所有研究对象的知情同意。

1.2 样本采集 所有患者均在手术、化疗或放疗前进行采样,空腹无菌采取静脉血5.0 mL,放置30 min后,1,200 g离心10 min,吸取上清至离心管中,4 °C 12,000 g再离心10 min后分离上清至新的离心管中,取250 μL血清加入750 μL TRIzol® LS试剂后-80 °C保存待用。

1.3 总RNA提取及cDNA第一链合成 参照文献^[13]严格按照TRIzol® LS试剂(美国Invitrogen公司)说明书进行血清总RNA提取,提取的RNA溶于DEPC处理的水中。采用逆转录试剂盒(美国Thermo Scientific公司)进行cDNA第一链合成,具体如下:3 μg总RNA、5 μg/μL Oligo(dT)1 μL温和混合后70 °C孵育5 min,冰上冷却,短暂离心收集上清;依次加入5×反应缓冲液4 μL、20 U/μL RNase抑制剂1 μL及10 mmol/L dNTP 2 μL 37 °C温和混合后孵育5 min;加入200 U/μL M-MuLV逆转录酶1 μL,42 °C 60 min、70 °C 10 min,冰上冷却终止反应;合成的cDNA第一链在-20 °C保存待用。

1.4 实时定量PCR检测 根据Genebank中HOTAIR及内参GAPDH的序列,利用Primer 5.0软件设计引物,具体序列如下:HOTAIR上游引物5'-GGCAGCACAGAGCAACTCTA-3',

下游引物5'-GCAGGGTCCCCTACTGCATAAT-3',扩增产物大小125 bp;GAPDH上游引物5'-ACTAGGCGCTCACTGTTCTCT-3',下游引物5'-GTTGACTCCGACCTTCACCT-3',扩增产物大小83 bp,由上海生工生物技术科技有限公司合成引物。利用SYBR® Premix Ex Taq™ II(大连宝生物工程有限公司)进行PCR扩增,20 μL反应体系包括10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II(2×)、模板3.0 μL、上下游引物(10 μM)各1.0 μL、ddH₂O 5.0 μL,PCR反应条件:95 °C预变性30 s,95 °C 10 s、60 °C 30 s共35个循环。扩增结束后得到Ct值,采用2^{-ΔΔCt}法计算血清中HOTAIR的表达水平。

1.5 统计学方法 所有数据均采用SPSS 16.0进行统计学处理,计量资料采用均数±标准差(Mean±SD)表示,组间比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOTAIR在NSCLC患者血清中的水平 实时定量PCR检测结果发现NSCLC患者血清中HOTAIR水平为(2.85±1.16),明显高于正常对照组(1.74±0.69),两组之间差异具有统计学意义(t=6.566, P<0.01)。

2.2 NSCLC患者血清中HOTAIR水平与临床病理参数之间的关系 为了进一步研究HOTAIR在NSCLC发生、发展中的作用,本研究统计分析了肺癌血清中HOTAIR水平与临床病理参数之间的关系,结果发现血清中HOTAIR水平与患者性别、年龄、吸烟、分化程度及病理类型均无明显相关(P>0.05)。而肿瘤大小>3 cm的肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于肿瘤大小≤3 cm患者,III期+IV期肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于I期+II期患者,有淋巴转移的肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于无淋巴转移的患者,差异均具有统计学意义(P<0.05),结果见表1。

3 讨论

非编码RNA(non-coding RNA)是指不编码蛋白质的RNA,其中包括rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA、microRNA、lncRNA及circRNA。由于lncRNA不编码蛋白质,最初被认为是基因组转录的“噪音”,不具有生物学功能。但随着RNA测序、芯片

表 1 NSCLC患者血清中HOTAIR水平与临床病理参数的关系

Tab 1 The relationships between the serum levels of HOTAIR and clinical pathological parameters in the patients with NSCLC

Clinical pathological parameters	Cases (n)	Relative expression of HOTAIR (Mean±SD)	t	P
Age (yr)			0.775	0.221
>65	17	3.04±1.28		
≤65	47	2.78±1.15		
Gender			0.333	0.739
Male	38	2.81±1.15		
Female	26	2.91±1.22		
Smoking			0.531	0.298
Yes	30	2.94±1.24		
No	34	2.78±1.17		
Tumor size			2.433	0.009
>3 cm	36	3.17±1.33		
≤3 cm	28	2.42±1.07		
TNM stage			2.539	0.007
I+II	35	2.49±1.13		
III+IV	29	3.28±1.36		
Differentiation			1.029	0.154
Well/Moderate	40	2.73±1.17		
Poor	24	3.05±1.26		
Lymph node metastasis			2.980	0.002
Negative	27	2.34±0.97		
Positive	37	3.22±1.29		
Histology ^a			0.896	0.187
Squamous cell carcinoma	23	2.67±1.18		
Adenocarcinoma	39	2.96±1.25		

^a: 2 cases of large cell carcinoma were not counted. NSCLC: non-small cell lung cancer; HOTAIR: HOX antisense RNA. TNM: tumor-node-metastasis.

等分子生物学技术和生物信息学的不断发展，越来越多的研究^[4-6]证实lncRNA具有复杂的生物学功能，在多个层面上参与细胞分化和个体发育调控，并与多种疾病尤其是恶性肿瘤的发生发展密切相关。国内外学者研究^[14-16]发现MALAT1、ANRIL、H19、MEG3、GASS及CCAT2等多种lncRNAs在肺癌中异常表达，与肺癌的发病、诊断、治疗及预后密切相关。HOTAIR是Rinn等^[7]发现的第一个具有反式转录调控作用的lncRNA，人HOTAIR基因定位于12q13区域，基因（RefSeq NR_003716）全长2,364 bp，由1个长外显子和5个短外显子组成，HOTAIR主要是通过5'结构域和3'结构域募集复杂蛋白复合体来调控靶基因的表达。多项研究发现HOTAIR不仅在乳腺癌、食管癌、胃癌、肝癌、结肠癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌等实体瘤中高表达^[17,18]，而且在淋巴瘤、

急性白血病等血液系统恶性肿瘤中也高表达^[19,20]。国内外学者^[8-12,21]研究发现NSCLC患者肿瘤组织中的HOTAIR的表达水平明显高于正常肺组织，细胞实验证实过表达HOTAIR可以显著促进A549细胞的迁移和侵袭，且与顺铂化疗耐药有关。由于lncRNA具有疾病特异性和组织特异性、稳定性高等特点，在心血管疾病、肿瘤患者外周循环中可以检测到lncRNA，有可能成为疾病诊断、预后的标志物^[22,23]。本研究采用实时定量PCR检测NSCLC患者血清中HOTAIR的水平，结果发现NSCLC患者血清中HOTAIR水平明显高于正常对照组（ $P<0.01$ ），这与国内外学者在肺癌组织中的研究结果一致^[8-12]，提示HOTAIR在NSCLC病理过程中发挥了重要作用。

本研究进一步分析了NSCLC患者血清中HOTAIR水平与临床病理参数之间的关系，结果发现肿瘤大小

>3 cm的肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于肿瘤大小≤3 cm患者, III期+IV期肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于I期+II期患者, 提示HOTAIR与TNM分期及肿瘤负荷有关, 与国内外学者研究结果^[8-12]一致, 本研究还发现I期+II期患者血清中HOTAIR水平仍然明显高于正常对照组 ($P<0.01$), 随着研究的不断深入HOTAIR有可能成为肺癌的早期诊断指标之一。同时研究结果还发现有淋巴转移的肺癌患者血清中HOTAIR水平明显高于无淋巴转移的患者, 有研究表明过表达HOTAIR可以显著促进肺癌细胞A549的迁移和侵袭^[11,24], 提示HOTAIR参与了肺癌的侵袭及转移过程。本研究结果显示肺癌患者血清中HOTAIR水平与患者性别、年龄、吸烟、分化程度及病理类型均无明显相关, 但张泽雨^[10]等发现NSCLC患者肿瘤组织中HOTAIR的水平与肿瘤的分化程度明显相关, 这可能与病例的选择有关, 有待于扩大样本量进行进一步研究。

综上所述, 本研究发现NSCLC患者血清中HOTAIR水平升高, 且与肿瘤大小、TNM分期及淋巴转移有关, 提示HOTAIR与肺癌的发生发展及转移有关, 但其具体作用机制尚不明确。由于肺癌的临床表现比较复杂, 早期症状不明显, 甚至可无任何不适, 因此肺癌的早期诊断尤为重要, 随着对HOTAIR研究的不断深入, 可能为肺癌的早期诊断及治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1): 47-62.
- Di Gesualdo F, Capaccioli S, Lulli M. A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 10976-10996.
- Melissari MT, Grote P. Roles for long non-coding RNAs in physiology and disease. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6): 945-958.
- Malek E, Jagannathan S, Driscoll JJ. Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget*, 2014, 5(18): 8027-8038.
- Chandra Gupta S, Nandan Tripathi Y. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: from biomarkers to therapeutic targets. *Int J Cancer*, 2017, 140(9): 1955-1967.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007, 129(7): 1311-1323.
- Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, *et al.* Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 90.
- Liu XH, Liu ZL, Sun M, *et al.* The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2013, 13: 464.
- Zhang ZY, Yi SM, Zhang Y. Expression and clinical significance of long non-coding RNA HOTAIR in non-small cell lung cancer. *Lin Chuang Fei Ke Za Zhi*, 2015, 20(1): 102-105. [张泽雨, 易升明, 张岩. 长链非编码RNA HOTAIR在非小细胞肺癌中的表达及意义. *临床肺科杂志*, 2015, 20(1): 102-105.]
- Lin MJ, Chen ZQ, Yin LD, *et al.* Influence of down-regulated long noncoding RNA HOTAIR on migration and invasion of non-small cell lung cancer cell lines. *Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi*, 2014, 19(8): 684-689. [林梦洁, 陈志强, 尹凌帝, 等. 长链非编码RNA HOTAIR对非小细胞肺癌迁移和侵袭能力的影响. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(8): 684-689.]
- Xue SM, Jia J, Shen H. Expression of lncRNA HOTAIR in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi*, 2016, 21(9): 780-784. [薛世民, 贾娟, 沈华. 非小细胞肺癌组织中lncRNA HOTAIR的表达及临床意义. *临床肿瘤学杂志*, 2016, 21(9): 780-784.]
- Yang X, Li BS, Hu CJ, *et al.* Establishment of detection method of serum lncRNA HOTAIR level and its significance in diagnosis of colon cancer. *Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2016, 38(10): 1148-1153. [杨歆, 黎伯胜, 胡长江, 等. 血清中lncRNA HOTAIR检测方法的建立及其在结肠癌诊断中的应用价值. *第三军医大学学报*, 2016, 38(10): 1148-1153.]
- Chen Y, Li C, Pan Y, *et al.* The emerging role and promise of long noncoding RNAs in lung cancer treatment. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(6): 2194-2206.
- Sang H, Liu H, Xiong P, *et al.* Long non-coding RNA functions in lung cancer. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4027-4037.
- Fan LM, Hu ZD. Progress of long non-coding RNAs in non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2016, 19(2): 108-112. [樊黎明, 胡志东. lncRNA在非小细胞肺癌中的研究进展. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(2): 108-112.]
- Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: a novel oncogene (Review). *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5611-5618.
- Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(1): 1-9.
- Yan Y, Han J, Li Z, *et al.* Elevated RNA expression of long non-coding HOTAIR promotes cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5125-5131.
- Wu S, Zheng C, Chen S, *et al.* Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2410-2414.

21 Liu MY, Li XQ, Gao TH, *et al.* Elevated HOTAIR expression associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Dis*, 2016, 8(11): 3314-3322.

22 Viereck J, Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury. *Circ Res*, 2017, 120(2): 381-399.

23 Qi P, Zhou XY, Du X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 39.

24 Zhou C, Ye L, Jiang C, *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR, a hypoxia-inducible factor-1 α activated driver of malignancy, enhances hypoxic cancer cell proliferation, migration, and invasion in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9179-9188.

(收稿: 2017-03-08 修回: 2017-04-12 接受: 2017-04-15)
(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Tan N, Li LH, Bai L, *et al.* Expression of Serum LncRNA HOTAIR in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2017, 20(6): 402-406. [谭楠, 李莉红, 白璐, 等. 非小细胞肺癌血清中lncRNA HOTAIR的表达及临床意义. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(6): 402-406.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2017.06.06

· 消息 ·

第二十届全国临床肿瘤学大会
暨2017年CSCO学术年会

本届大会的主题为“传承创新，携手同行”。大会将秉承CSCO的根本宗旨，进一步促进国际、国内临床肿瘤学领域的学术交流和科技合作，鼓励支持临床研究和创新，提倡多学科规范化综合治疗基础上的精准肿瘤学，积极推动学科大发展。欢迎广大CSCO会员和临床肿瘤学工作者积极投稿，切磋实践经验和分享研究成果，大会将在黄金时段特别安排原创性研究进行口头报告和展板交流，邀请著名专家进行点评；将举办一系列的专题论坛会，特别邀请国内、外著名的专家学者进行精彩的进展报告或讲座，力求全面而准确地反映临床肿瘤学领域的新观念、新知识和新技术。年会同期将与ASCO、ESMO、IASLC和SSOACS等多家国际学会组织联合举办国际专场（International Session），共商抗癌大计，大力推动国际和国内专家广泛而深入的学术交流和科技合作，努力为全球的临床肿瘤学事业做出重要贡献。大会组委会和学术委员会将征集优秀的学术报告和特约稿件，编辑成为《中国临床肿瘤学进展2017》，由人民卫生出版社正式出版；而高质量的投稿论文将被收入“2017年CSCO大会论文摘要汇编”。学术委员会将认真讨论和采取无记名投票的方式，评选出“中国临床肿瘤学优秀论文”。按照惯例，大会期间还将举办抗癌新药、仪器设备和新书刊展览。

会议网站: <http://reg.cSCO.org.cn/>

会议主题: 传承创新，携手同行 (Together we innovate on our inheritance)

时间: 2017年9月26日-9月30日 地点: 福建省厦门市国际会议展览中心