

长链非编码 RNA *HOTAIR* mRNA 在卵巢癌中的表达^{*}

崔玲^{1,2,3}, 谢晓砚^{2,3,4}, 王和^{1,2,3△}, 陈新莲^{1,2,3}, 刘珊玲^{2,3,4}, 胡丽娜²

1. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 遗传实验室(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 妇产科教研室(成都 610041); 3. 妇科疾病与出生缺陷教育部重点实验室(成都 610041);
4. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 细胞与基因治疗实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA *HOTAIR* 转录反义 RNA(*HOTAIR*) 在卵巢癌组织与正常卵巢组织中的表达差异。**方法** 对 44 例卵巢癌组织及 14 例正常卵巢组织样本采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)方法检测长链非编码 RNA *HOTAIR* mRNA 的表达。**结果** 卵巢癌组织中 *HOTAIR* mRNA 表达高于正常卵巢组织[(1.26 ± 0.27) vs. (0.14 ± 0.09)], 差异有统计学意义($P < 0.05$), 病理类型为低度分化及未分化的卵巢癌组织中 *HOTAIR* mRNA 表达高于中-低、中-高及高度分化组织[(1.65 ± 0.41) vs. (0.39 ± 0.14)], 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 卵巢癌组织中 *HOTAIR* 的表达增高, 且癌组织分化越低, *HOTAIR* 表达越高。提示 *HOTAIR* 有可能作为发现卵巢癌, 并判断其恶性程度的一个分子标志。

【关键词】 长链非编码 RNA *HOTAIR* 卵巢癌 实时荧光定量 PCR

Expression of Long Non-coding RNA *HOTAIR* mRNA in Ovarian Cancer CUI Ling^{1,2,3}, XIE Xiao-yan^{2,3,4}, WANG He^{1,2,3△}, CHEN Xin-lian^{1,2,3}, LIU Shan-ling^{2,3,4}, HU Li-na². 1. Laboratory of Genetics, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetric and Gynecologic, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 4. Laboratory of Cell and Gene Therapy, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: wanghe_cd@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the long non-coding RNA *HOTAIR* (long non-coding HOX antisense intergenic RNA) by examining *HOTAIR* expression levels in ovarian cancer tissue and normal ovarian tissue. **Methods** The mRNA of long non-coding RNA *HOTAIR* expressions were detected by real-time fluorescence quantitative PCR in ovarian cancer (44) and normal ovary tissues (14). **Results** The expression of *HOTAIR* in ovarian cancer tissue was higher than that in normal ovarian tissue (1.26 ± 0.27 vs. 0.14 ± 0.09, $P < 0.05$). The expression was statistically higher in poorly differentiated ovarian cancer than poorly-moderately, moderately-well, and well-differentiated ones (1.65 ± 0.41 vs. 0.39 ± 0.14, $P < 0.05$). **Conclusion** RNA *HOTAIR* expressions were higher in ovarian cancer; it may play a role in ovarian cancer, and become a biomarker for malignant degree of ovarian cancer and may provide a novel therapeutic target for ovarian cancer.

【Key words】 Long non-coding RNA *HOTAIR* Ovarian cancer Real-time fluorescence quantitative PCR

卵巢癌是妇科常见肿瘤之一, 临床症状隐匿, 诊断时超过 80% 的患者已属晚期, 恶性上皮性肿瘤最为常见, 好发于 50~60 岁妇女, 死亡率居妇科恶性肿瘤首位, 相当一部分患者在手术和化疗后仍会出现疾病进展或复发, 5 年生存率不到 30%^[1]。因此开发对卵巢癌的新型治疗手段非常重要。

一直以来认为非编码基因(non-coding RNA, ncRNA)及长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)只调节邻近基因的表达, 不具有生物学功能。近年来的研究表明, ncRNA 可能具有调

节癌基因、抑癌基因, 或其自身具有癌基因和抑癌基因的功能, 并参与多种信号传导途径的调控。来源于 HOXC 基因座的 lncRNA (*HOTAIR*), 存在于 HOXC11 和 HOXC12 之间, 在各种组织中调节 HOXD 的表达, 在组蛋白修饰和基因正确表达方面有调节作用^[2,3]。它能够招募染色质重构复合体 PRC2 并将其定位到 HOXD 位点, 进而诱导 HOXD 位点的表观遗传学沉默, 后续的研究显示, *HOTAIR* 在大约四分之一的人类乳腺癌中过表达, 成为人类乳腺癌死亡和转移的一个独立的标志^[4,5]。

目前还未见 *HORAIR* mRNA 在妇科肿瘤领域的研究报道, 我们拟通过实时荧光定量 PCR(RT-

^{*} 长江学者和创新团队(PCSIRT)发展计划(No. IRT0935)资助

△ 通讯作者, E-mail: wanghe_cd@126.com

PCR)方法,观察 *HOTAIR* mRNA 在卵巢癌和正常卵巢组织中的表达差异,分析 *HOTAIR* 在卵巢癌不同病理类型与不同分化类型中的表达,以及 *HOTAIR* 对卵巢癌转移的影响,为今后揭示卵巢癌发生机制及开发基因治疗提供可能的靶点。

1 材料与方法

1.1 卵巢癌和正常卵巢组织

本实验所有组织来源于2009年5月至2010年12月四川大学华西第二医院行手术治疗患者术中切除的新鲜组织,卵巢癌组织44例(病例组)来源于术前诊断卵巢癌,术后病理确诊卵巢癌患者,其中低分化浆液性腺癌18例,低分化浆液-黏液性腺癌8例,低-中分化浆液性腺癌6例,低-中分化浆液-黏液性腺癌3例,中-高分化浆液性腺癌2例,中-高分化浆液-黏液性腺癌2例,高分化浆液性腺癌1例,高分化黏液性腺癌1例,透明细胞癌2例,未分化癌1例;其中发生淋巴结或大网膜等转移25例,未发生转移19例。正常卵巢14例(对照组)来源于因其他疾病(包括宫颈癌、宫颈上皮内瘤变、子宫肌瘤老年患者,子宫内膜癌患者)行手术切除卵巢,术后病理未提示卵巢癌病变的患者。病例组患者平均年龄(49.30 ± 1.47)岁,对照组年龄(54.83 ± 1.98)岁,两组患者年龄差异无统计学意义。患者均已签署知情同意书。

1.2 主要试剂

PCR引物(上海生工生物工程有限公司),TRIZOL试剂(Invitrogen),逆转录试剂盒(TaKaRa公司),Eva Green(百乐公司),焦碳酸二乙酯(DEPC,上海生工生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本处理 所有标本切下后用DEPC水处理后的冻存管存放于 -80°C 冰箱备用。

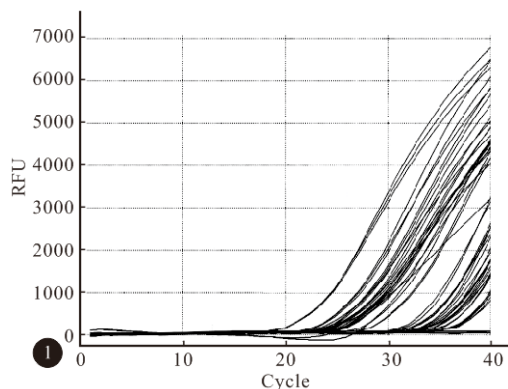


图1 *HOTAIR* 及 *GAPDH* 基因 RT-PCR 扩增曲线

Fig 1 Amplification curve of *HOTAIR* and *GAPDH* gene

1.3.2 提取总 RNA 及逆转录 按照说明书要求,使用 TRIZOL 提取组织总 RNA,用 gDNA Eraser 去除基因组 DNA,1 μg 总 RNA 在 20 μL 体系中应用逆转录试剂盒进行逆转录反应,将 cDNA 存于 -80°C 备用。

1.3.3 RT-PCR 检测 *HOTAIR* mRNA 表达 mRNA 的表达水平运用 RT-PCR (Biosystems CFX96)检测每个扩增循环后 EvaGreen 荧光信号水平。内参 *GAPDH* 及 *HOTAIR* 引物经 BLAST 比对后由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列:*GAPDH* 上游 5'-CCGGGAACTGTGCGTGATGG-3',下游 5'-AGGTGGAGGTATGGGTGTCGCTGTT-3',扩增产物片段长度为 309 bp,*HOTAIR* 上游 5'-GGTAGAAAAAGCAACCA CGAAGC-3',下游 5'-ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC-3',扩增产物片段长度为 170 bp^[6,7]。10 μL 反应体系,反应条件:预变性 98°C 30 s 后,进行 40 个循环反应: 95°C 5 s, 60°C 5 s。运用熔解曲线检测扩增产物的纯度。获得 C_t 值,采用 RT-PCR 相对定量方法对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行统计分析^[8]。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌与正常卵巢组织 *HOTAIR* mRNA 表达的比较

结果见图1、图2。熔解曲线呈单峰,扩增产物纯度佳,无二聚体形成,熔解温度 $88 \sim 88.5^{\circ}\text{C}$,得到相应 C_t 值,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算显示卵巢癌组织 *HOTAIR* mRNA 表达量(1.26 ± 0.27)比正常卵巢组织(0.14 ± 0.09)高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

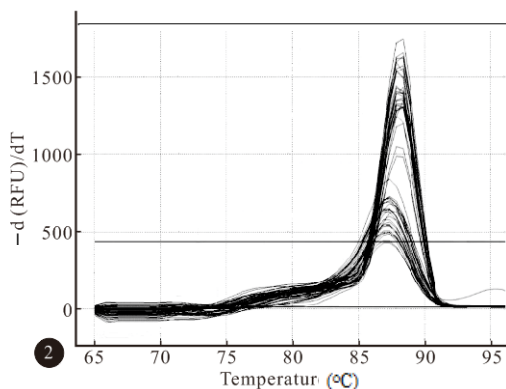


图2 *HOTAIR* 及 *GAPDH* 基因 RT-PCR 熔解曲线

Fig 2 Melting peaks of *HOTAIR* and *GAPDH* gene

2.2 不同分化程度卵巢癌 *HOTAIR* mRNA 表达的比较

26 例低度分化及 1 例未分化卵巢癌中 *HOTAIR* mRNA 表达量(1.65 ± 0.41)比 15 例中-低、中-高及高度分化卵巢癌(0.39 ± 0.14)高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 *HOTAIR* mRNA 在转移与非转移卵巢癌间的比较

发生大网膜、淋巴结等远处转移的 25 例卵巢癌与未发生远处转移的 19 例卵巢癌比较,*HOTAIR* mRNA 表达差异无统计学意义[(1.01 ± 0.33) vs. (1.61 ± 0.46), $P > 0.05$]。

2.4 *HOTAIR* mRNA 在浆液性卵巢癌和浆液-黏液混合性卵巢癌的比较

27 例浆液性卵巢癌与 13 例浆液-黏液混合性卵巢癌比较,*HOTAIR* mRNA 表达差异无统计学意义[(1.45 ± 0.40) vs. (0.68 ± 0.28), $P > 0.05$]。

3 讨论

近年来的研究表明 lncRNA 参与了染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程^[9-11]。HOX 基因是同源形基因家族中高度保守的亚型,对发育起到至关重要的作用,调节包括凋亡、信号接受、分化、血管的发生等。最近发现 lncRNA *HOTAIR* 可以连接导致肿瘤转移的染色质^[5],提示 lncRNA 与人类疾病关联。大量研究表明在哺乳动物编码子中,大于 50% 的转录没有蛋白质编码位点, lncRNA 功能大多不为人知,有文献表明其并不翻译成蛋白质而是直接以 RNA 形式作用^[4]。在组蛋白修饰和基因正确表达方面有调节作用,也可能起到分子支架作用^[2,3]。它能够招募染色质重构复合体 PRC2 并将其定位到 HOXD 位点,进而诱导 HOXD 位点的表观遗传学沉默。

本研究系首次检测 *HOTAIR* 在卵巢癌组织中的表达,结果提示 *HOTAIR* mRNA 在卵巢癌组织中表达量明显高于正常卵巢组织。有研究表明 *HOTAIR* 在大约四分之一的人类乳腺癌中过表达,成为人类乳腺癌死亡和转移的一个独立的标志^[4,5]。Yang 等^[12]报道 *HOTAIR* 在肝细胞癌组织比邻近非癌灶组织中表达高,并且高表达 *HOTAIR* 的患者无复发的生存期明显更短。这种过表达可能使 *HOTAIR* 成为卵巢癌患者预测复发的一种标记物。Yang 等^[12]利用 siRNA 抑制肝癌细胞中 *HOTAIR*,降低了细胞活性和侵蚀性,增加了 TNF- α 诱导凋亡的敏感性并增加了肝癌细胞对化疗的敏感性,这也可能使 *HOTAIR* 成为一种潜在的肿瘤治疗靶点。

本研究根据卵巢癌分化程度进行分组分析,结果提示在低度分化的卵巢癌组织中 *HOTAIR* mRNA 表达明显高于低-中、中-高及高度分化的卵巢癌组织。由于组织学分级低度分化的细胞恶性程度更高,同时低分化卵巢癌发生复发、转移的可能性更高,预后较差,这提示 *HOTAIR* 可能与卵巢癌的发生、转移及预后密切相关。卵巢癌中 *HOTAIR* 的过表达有望成为预测卵巢癌复发的标记物。

本研究对发生大网膜、淋巴结等远处转移和未发生转移的卵巢癌组织进行分组分析,结果提示 *HOTAIR* mRNA 表达差异无统计学意义。这可能与组间基线(如卵巢癌的类型、患者年龄、分化程度等)不一致有关,尚需进一步研究。本研究收集组织病理类型中 90% 以上为上皮细胞肿瘤,我们将浆液性卵巢癌及浆液-黏液混合性卵巢癌进行分组分析,结果提示差异无统计学意义,可能系卵巢浆液性癌和黏液性癌均属于上皮细胞肿瘤,恶性程度高,容易复发、转移,故两者无明显区别。

综上所述,*HOTAIR* 作为发现卵巢癌、并判断其恶性程度的一个分子标志,有望成为卵巢癌基因治疗的靶点。但其与卵巢癌复发和转移的关系尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 彭小宁, 彭司华, 曾小敏. 卵巢癌早期诊断方法的研究进展. 国际病理科学与临床杂志, 2007; 27(6): 489-492.
- 2 Spitale RC, Tsai MC, Chang HY. RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. Epigenetics, 2011; 6(5): 539-543.
- 3 He S, Liu S, Zhu H. The sequence, structure and evolutionary features of *HOTAIR* in mammals. BMC Evol Biol, 2011; 11: 102.
- 4 Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation prospects and mechanisms. RNA Biol, 2010; 7(5): 582-585.
- 5 Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA *HOTAIR* reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature, 2010; 464(7291): 1071-1076.
- 6 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.
- 7 Woo CJ, Kingston RE. *HOTAIR* lifts noncoding RNAs to new levels. Cell, 2007; 129(7): 1257-1259.
- 8 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Methods, 2001; 25(4): 402-408.
- 9 Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. Genes Dev, 2005; 19(14): 1635-1655.
- 10 Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet, 2009; 10(3): 155-159.
- 11 Lee JT. Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. Genes Dev, 2009; 23(16): 1831-1842.
- 12 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. Ann Surg Oncol, 2011; 18(5): 1243-1250.

(2012-07-10 收稿, 2012-11-01 修回)

编辑 余琳