

LncRNA HOTAIR、HOTTIP 及其下游 HOXD10、HOXA13 基因在肺癌中的表达研究

刘敏¹⁾, 曾龙剑¹⁾, 姚树祥¹⁾, 何越峰¹⁾, 杨凯云²⁾, 李光剑²⁾, 吴锡南¹⁾

(1) 昆明医科大学公共卫生学院环境卫生与职业医学系, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第三附属医院心胸血管外科, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 探讨 HOTAIR 和 HOTTIP 及其下游 HOXD10 和 HOXA13 基因在肺癌中的表达特征以及相互调控的关系. **方法** 选择 47 例肺癌患者并收集癌组织和癌旁正常组织, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测基因相对表达量. **结果** HOTAIR 在癌组织中的相对表达量 (4.12 ± 4.58), 显著低于癌旁正常组织 (7.43 ± 4.20), ($P < 0.01$), HOXA13 在癌组织中的相对表达量 (8.64 ± 1.21), 显著降低低于癌旁正常组织 (9.43 ± 1.58), ($P < 0.01$), 其他两个基因表达无显著变化. 在有淋巴转移的个体中, 癌组织中 HOXD10 mRNA 表达为 (9.01 ± 1.22), 显著高于无转移的患者 (7.81 ± 2.15), ($P = 0.02$). HOTTIP 与下游 HOXA13 基因 RNA 在癌组织 ($r = 0.78$, $P = 0.00$) 和癌旁正常组织 ($r = 0.70$, $P < 0.01$) 中均存在正相关关系; HOTAIR 与下游 HOXD10 基因 mRNA 在癌旁正常组织中成正相关 ($r = 0.37$, $P < 0.01$), 在癌组织中却不存在相关关系 ($r = 0.12$, $P = 0.47$). **结论** 提示在肺癌中 HOTTIP 与 HOXA13 调控关系正常; HOTAIR 在癌组织中表达降低, 且可能丧失对下游基因 HOXD10 的正常调控.

[关键词] 肺癌; HOTAIR; HOTTIP; 调控关系

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0049-04

The Expression of HOTAIR, HOTTIP and Its Downstream HOXD10, HOXA13 Genes in Lung Cancer

LIU Min¹⁾, ZENG Long-jian¹⁾, YAO Shu-xiang¹⁾, HE Yue-feng¹⁾, YANG Kai-yun²⁾, LI Guang-jian²⁾, WU Xi-nan¹⁾

(1) Dept. of Environment and Occupation Health, School of Public Health, Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650500; 2) Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650118, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression characteristics of HOTAIR and HOTTIP and their downstream HOXD10 and HOXA13 genes in lung cancer, as well as the relationship of mutual regulation. **Methods** We selected 47 patients with lung cancer and collected their cancer tissue and adjacent normal tissue, then used TRIzol to extract total RNA and real-time quantitative PCR to detect relative gene expression levels. **Results** HOTAIR and HOXA13 relative expression levels in cancer tissues were significantly lower than in adjacent normal tissues (4.12 ± 4.58) vs (7.43 ± 4.20) $P < 0.01$, (8.64 ± 1.21) vs (9.43 ± 1.58) $P < 0.01$, and the other three genes expressions were not significantly changed. HOXD10 mRNA expression levels in the cancer tissue of individuals with lymph node were significantly higher than patients without lymph node (9.01 ± 1.22) vs (7.81 ± 2.15), $P = 0.02$. There were positive correlation relationships between the expressions of HOTTIP and its downstream gene

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2009CD081); 云南省科技厅一昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2010CD181)

[作者简介] 刘敏 (1987~), 女, 山西晋中市人, 在读硕士研究生, 主要从事基因表达研究工作.

[通讯作者] 吴锡南. E-mail:wuxinan@kmmu.edu.com

HOXA13 mRNA in cancer tissue ($r = 0.78$, $P < 0.01$) and adjacent normal tissue ($r = 0.70$, $P < 0.01$); the HOTAIR and its downstream HOXD10 gene mRNA in adjacent normal tissue were positively related ($r = 0.37$, $P = 0.01$), but not correlated in cancer tissues ($r = 0.12$, $P = 0.47$). **Conclusions** The regulation between HOTTIP and HOXA13 is normal in lung cancer. The expression of HOTAIR decreases in cancer tissues, and HOTAIR may lose the normal regulation of downstream genes of HOXD10.

[**Key words**] Lung cancer; HOTAIR; HOTTIP; Regulatory relationships

长链非编码 RNA (LncRNA) 是一类转录本长度超过 200 nt (核苷酸单位) 的功能性非编码 RNA 分子, 它们缺乏编码蛋白的能力^[1]. 长期以来 LncRNA 被认为是转录过程中的副产物而不具有生物学功能^[2]. 近年随着微小 RNA (microRNA, miRNA) 的研究进展, 揭示了非编码 RNA 在人类基因转录后调节、细胞生长、分化、增殖中起着相当重要的作用. LncRNA 在细胞内转录比例相比 miRNA 更高, 具有极其复杂而重要的生物学功能, 与人类疾病密切相关并受到广泛关注^[3].

HOTAIR 和 HOTTIP 是近来新发现的两个功能性 LncRNA, 体外细胞实验表明 HOTAIR 通过控制 HOXD10、HOXC11 等基因, HOTTIP 通过控制 HOXA13 等基因的转录发挥功能^[4,5]. 有研究表明 HOTAIR 在乳腺癌、结肠癌和肝癌肿瘤中表达异常^[6-9], 而 HOTTIP 在肿瘤中表达尚未见文献报道. 因此本研究利用实时荧光定量的方法检测 47 例肺癌组织及癌旁组织中 HOTAIR 和 HOTTIP 及其下游 HOXD10、HOXA13 基因 mRNA (messenger RNA, 信使 RNA) 的表达, 探讨其在肺癌中的表达与组织类型、TNM 分期等关系以及上下游基因在正常和癌组织相互调控关系的变化.

1 资料与方法

1.1 病例收集

在取得知情同意后, 收集昆明医科大学第三附属医院 2010 年 10 月至 2011 年 6 月住院患者外科手术切除的肺癌组织及癌旁的正常组织 (癌旁的正常组织离癌组织 5 cm 以上), 取下后 10 min 以内放入预先装有 RNAlater (美国 Ambion 公司) 溶液的试管中, 先在 -4°C 浸泡 8 h 然后放入 -80°C 冰箱中长期保存. 术后通过查阅病理切片记录确认组织病理类型, 成功收集 15 例鳞癌 32 例腺癌.

共收集 47 例样本, 其基本情况: 民族均为汉族; T 分期: 1 期 4 例, 2 期 26 例, 3 期 10 例, 4 期 7 例; N 分期: 0 期 18 例, 1 期 5 例, 2 期 23

例, 3 期 1 例; M 期 0 期: 43 例 1 期 4 例. 组织类型为腺癌 32 例, 鳞癌 15 例; 年龄为最大 71 岁, 最小 32 岁, 平均 (54.91 ± 9.62) 岁; 性别为男 32 例女 15 例; 吸烟的 29 例占 62%; 饮酒的 22 例占 47%; 分化程度为: 低分化 18 例, 中分化 28 例, 高分化 1 例; 其中 32 例腺癌的检测了 GST π 、PgP、TOPO II、LRP、MRP、P53、Ki67 免疫组织化学指标, GST π : 5 例 (-)、15 例 (+)、9 例 (++)、3 例 (+++); PgP: 7 例 (-)、14 例 (+)、9 例 (++)、2 例 (+++); TOPO II: 6 例 (-)、20 例 (+)、6 例 (++)); LRP: 2 例 (-)、14 例 (+)、13 例 (++)、3 例 (+++); MRP: 4 例 (-)、13 例 (+)、15 例 (++)); P53: 9 例 (-)、15 例 (+)、7 例 (++)、1 例 (+++); Ki67: 5%~90% 平均数为 32.67%.

1.2 RNA 的提取和定量

利用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 利用 Quant Script RT 试剂盒 (中国天根公司) 进行逆转录, 按说明书操作. 利用实时荧光定量 PCR 的方法对 4 个 RNA 进行定量, 其仪器为 ABI 公司的 7900HT, 定量引物的序列来自于参考文献^[5,7], 实验的操作方法按照 Invitrogen 说明书进行, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值表示 4 个 RNA 在组织中的相对表达量.

1.3 数据处理

将数据核对后录入数据库利用 SPSS 统计, 经过对数转化后呈正态性, 表中所示数据为转化后的数据, 2 组之间的比较用 t 检验, 利用 Spearman 等级相关分析数据之间的关联性.

2 结果

2.1 基因在肺癌组织以及正常组织中的表达特征

HOTAIR 在肺癌组织中表达显著降低 ($P < 0.05$), 平均表达量仅为正常组织中的 10.08%, HOXA13 在肺癌组织中表达显著降低 ($P < 0.05$), 平均表达量仅为正常组织中的 57.83%, 其他两个基因表达未见显著变化 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.2 4 个基因在不同组织类型肺癌中的表达特征

4 个基因在两种不同的组织类型的肺癌组织中表达未有显著差别 ($P > 0.05$), 未发现组织特异性, 见表 2.

2.3 HOTAIR、HOTTIP、HOXD10 和 HOXA13 基因与临床各指标之间的关系

通过 Spearman 等级相关和直线回归分析癌组织中 HOTAIR、HOTTIP、HOXD10 和 HOXA13 基因的表达与 TNM 分期以及 GSTP π 、PGP、TOPO II、LRP、MRP、P53、KI67 的关系分析, 发现

HOXD10 与 KI67 成负相关, HOXD10 和淋巴转移成正相关, 见表 3. 在有淋巴转移的个体中, 癌组织中 HOXD10 表达显著高于无转移的患者 ($P < 0.05$), 见表 4.

2.4 HOTAIR 和下游 HOXD10 基因以及 HOTTIP 和下游 HOXA13 基因的表达关系

HOTAIR 与 HOXD10 仅在正常组织中成正相关, 而在肺癌组织中未表现出相应的相关性, HOTTIP 与 HOXA13 在肺癌组织和癌旁正常组织中均表现为正相关关系, 见表 5.

表 1 HOTAIR、HOTTIP、HOXD10 和 HOXA13 在肺癌组织以及正常组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Expression of HOTAIR, HOTTIP, HOXD10 and HOXA13 in lung cancer tissues and normal tissues ($\bar{x} \pm s$)

基 因	正常组织	肺癌组织	<i>t</i>	<i>P</i>
HOTAIR	7.43 ± 4.20	4.12 ± 4.58	-3.59	0.00
HOXD10	8.76 ± 1.91	8.56 ± 1.71	-0.51	0.310
HOTTIP	8.18 ± 1.50	8.16 ± 1.48	-0.09	0.460
HOXA13	9.43 ± 1.58	8.64 ± 1.21	-2.61	0.010

表 2 HOTAIR、HOTTIP、HOXD10 和 HOXA13 在不同组织类型肺癌中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expression of HOTAIR, HOTTIP, HOXD10 and HOXA13 in different types of lung cancer tissues ($\bar{x} \pm s$)

基 因	腺癌组织	鳞癌组织	<i>t</i>	<i>P</i>
HOTAIR	3.85 ± 5.30	4.77 ± 1.96	-0.11	0.550
HOXD10	8.53 ± 1.87	8.63 ± 1.31	-0.19	0.850
HOTTIP	8.17 ± 1.56	8.12 ± 1.35	-0.05	0.920
HOXA13	8.78 ± 1.39	8.66 ± 1.36	-0.14	0.800

表 3 HOTAIR、HOTTIP、HOXD10 和 HOXA13 基因与临床各指标之间的关系 ($n = 32$)

Tab. 3 Relation of clinical indexes and the expression of HOTAIR, HOTTIP, HOXD10 and HOXA13 ($n = 32$)

参 数	<i>rs</i>
HOTAIR 和 TOPO II	-0.34
HOTAIR 和 P53	-0.33
HOTTIP 和 TOPO II	-0.34*
HOTTIP 和 P53	0.32
HOXD10 与 KI67	-0.41*
HOXD10 与淋巴转移 (N)	0.28*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 HOXD10 在有淋巴转移的个体和无淋巴转移的个体的癌组织中的表达 [$n = 47$, ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 4 Expression of HOXD10 in lung cancer tissues with or without lymphnode metastasis [$n = 47$, ($\bar{x} \pm s$)]

基 因	无转移	有转移	<i>t</i>	<i>P</i>
HOXD10	7.81 ± 2.15	9.01 ± 1.22	-2.37	0.02

表 5 HOTAIR 和下游 HOXD10、HOTTIP 和下游 HOXA13 基因在不同组织中的表达关系

Tab. 5 Expression of HOTAIR and its downstream HOXD10, HOTTIP and its downstream HOXA13 in different tissues

基 因	组织类型	<i>rs</i>
HOTAIR 与 HOXD10	肺癌组织	0.12
	正常组织	0.37**
HOTTIP 与 HOXA13	肺癌组织	0.78**
	正常组织	0.70**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

在 LncRNA 中 HOTAIR 是研究较多的一个分子, 通过重编程染色体状态控制以 HOXD10 为代表的多个基因表达实现其功能, 并和乳腺癌和肝癌密切相关^[7-9]。本研究发现 HOTAIR 在肺癌组织中显著降低, 提示在肺癌发生中 HOTAIR 基因可能也起到重要作用。HOXD10 是一个和肿瘤密切相关的基因, 虽然癌组织中表达和正常组织中未见显著差异, 但和有淋巴转移相关, 其在有淋巴结转移个体的癌组织中表达显著升高^[10]。体外细胞实验证据表明 HOXD10 表达受 HOTAIR 基因的控制^[7]。本研究中二者在正常组织中成正相关, 进一步证明了体外实验的结果, 并说明在人体环境中这种关系仍然存在。在癌组织中二者表达并未相关, 可能是由于癌组织中部分基因在调控关系的改变和紊乱。HOTTIP 基因在肿瘤中表达尚未见文献报道, 研究表明 HOTTIP 并未在肿瘤中异常表达, 作为 HOTTIP 的下游基因 HOXA13 在癌组织中表达却降低, 并且在正常组织和癌组织中均为正相关关系, 一方面证明体外细胞实验证据表明 HOXA13 表达受 HOTTIP 基因的调控的事实, 另一方面提示 HOXA13 在肺癌组织中表达降低可能并不是受到 HOTTIP 表达的影响所造成^[5]。

肿瘤的发生、发展、转移等影响因素和机制是非常复杂的, 进一步了解其过程需要更大的样本, 更深入完整的研究, 但是本研究清楚的反映出上述四个基因的表达以及其上下游之间的关系, 为肿瘤的研究提供了线索。

[参考文献]

- [1] WASHIETL S, HOFACKER I L, LUKASSER M, et al. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome[J]. *Nature biotechnology*, 2005, 23(11):1 383 - 1 390.
- [2] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629 - 641.
- [3] 王俊青, 张彦洁, 任建敏, 等. 长链非编码RNA生物学功能及其意义研究进展 [J]. *生命科学*, 2012, 5(6): 543 - 548.
- [4] RINN J L, KERTESZ M, WANG J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by non-coding RNAs[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1 311.
- [5] WANG K C, YANG Y W, LIU B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression [J]. *Nature*, 2011, 472(7 341):120 - 124.
- [6] KIM K, JUTOORU I, CHADALAPAKA G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 21(193):1 - 10.
- [7] GUPTA R A, SHAH N, WANG K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*, 2010, 464(7 291):1 071 - 1 076.
- [8] KOGO R, SHIMAMURA T, MIMORI K, et al. Long non-coding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers [J]. *Cancer research*, 2011, 71(20):6 320 - 6 326.
- [9] YANG Z, ZHOU L, WU L M, et al. Over expression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation [J]. *Annals of surgical oncology*, 2011, 18(5):1 243 - 1 250.
- [10] WANG L, CHEN S, XUE M, et al. Homeobox D10 gene, a candidate tumor suppressor, is down regulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis[J]. *Mol Med*, 2012, 9(18):389 - 400.

(2014-07-02 收稿)