

文章编号 1006-8147(2016)02-0126-03

论 著

长链非编码 RNA HOTAIR 在膀胱癌中的表达及临床意义

李宁, 马骏

(天津医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨长链非编码 RNA HOTAIR 在膀胱癌组织与癌旁正常组织的表达差异,了解 HOTAIR 与膀胱癌恶性程度、进展及预后的相关性。方法:采用 qRT-PCR 方法检测 88 例膀胱癌组织与癌旁正常组织中 HOTAIR RNA 的差异表达,分析 HOTAIR 表达水平与患者临床病理特征的关系,采用 Kaplan-Meier 生存分析及 COX 比例风险回归模型分析 HOTAIR 表达水平与膀胱癌患者预后的相关性。结果:膀胱癌组织中 HOTAIR RNA 表达明显高于癌旁正常组织,HOTAIR RNA 高表达与肿瘤高分级及临床高分期有关 ($P<0.05$),HOTAIR 高表达组膀胱癌患者 5 年生存率明显低于 HOTAIR 低表达组 ($P<0.05$),COX 回归分析提示 HOTAIR RNA 高表达可能为膀胱癌不良预后的独立危险因素之一。结论:长链非编码 RNA HOTAIR 与膀胱癌发生发展及其恶性程度相关,HOTAIR 可以作为预测膀胱癌患者生存率的分子标志物。

关键词 长链非编码 RNA; HOTAIR; 膀胱癌

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

Clinical significance of HOTAIR expression in patients with bladder cancer

LI Ning, MA Jun

(Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the HOTAIR expression in bladder cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues and its potential relevance to clinicopathological variables and prognosis. **Methods:** HOTAIR RNA expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction in 88 pairs of bladder cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues. Kaplan-Meier analysis and COX proportional hazards regression models were used to investigate the correlation between HOTAIR expression and prognosis of bladder cancer patients. **Results:** This study showed that the expression level of HOTAIR in bladder cancer tissues was significantly higher than those in non-cancerous tissues. The results indicated that high expression of HOTAIR in bladder cancer was associated with advanced stage and high grade ($P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis suggested that patients with high HOTAIR expression was associated with poor overall survival ($P<0.05$). Multivariate analysis revealed that HOTAIR expression was an independent predictor of overall survival. **Conclusions:** HOTAIR might play a positive role in bladder cancer development and could serve as an biomarker for overall survival of bladder cancer.

Key words long non-coding RNA; HOTAIR; bladder cancer

膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,据美国国家癌症研究所统计,2014 年美国有 74 690 例新发膀胱癌病例,其中男性 56 390 例,女性 18 300 例,并有 15 580 例患者死于膀胱癌^[1]。我国膀胱癌发病率低于欧美国家,但近 10 年来其发病率逐年增加^[2]。75% 的新发膀胱癌为非肌层浸润性膀胱癌,非肌层浸润性膀胱癌具有较高的复发率,并有一部分发展为肌层浸润性膀胱癌^[3-4],这使得膀胱癌成为治疗花费最多的恶性肿瘤之一^[5]。肌层浸润性膀胱癌患者的预后较差,约有 50% 的肌层浸润性膀胱癌患者在诊断后 3 年发生转移和死亡^[6]。目前膀胱癌的治疗选择和预后判断主要依赖临床分

期和病理分级,然而具有同样临床和病理特点的病人,预后却存在着极大的不同,因此迫切需要寻找有助于膀胱癌早期诊断和预后判断的新的生物指标^[7]。近年来研究发现长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在正常细胞与肿瘤细胞的基因表达调控中起着重要作用,并且 lncRNA 的异常表达与肿瘤发生、进展密切相关;lncRNA 可以作为肿瘤预后的判断指标及新的治疗靶点^[8]。HOTAIR 是第一个被发现的具备反式调节转录作用的 lncRNA,近年来的研究证明 HOTAIR 在多种恶性肿瘤中高表达,在肿瘤的发生发展中具有重要作用,其表达量与肿瘤的转移、进展及预后有着重要联系^[9]。而目前膀胱癌中 HOTAIR 的研究相对较少,我们拟通过检测膀胱癌组织 HOTAIR 的表达情况,

作者简介 李宁(1984-),女,硕士在读,研究方向:流行病与卫生统计学;通信作者:马骏,E-mail:majun@tmu.edu.cn。

分析其与膀胱癌临床病理参数的相关性,明确其对膀胱癌预后的指示作用。

1 材料与方法

1.1 组织标本 本研究 88 例组织标本来源于天津某医院 2006–2008 年经全膀胱手术切除的膀胱癌组织及癌旁正常组织,其中男性患者 77 例,女性患者 11 例,患者术前未行放疗、化疗,所有标本在手术切除离体后立即置入液氮冷冻,后转入 -80°C 条件下低温保存,取距离肿瘤边缘 3 cm 以上的正常膀胱黏膜作为对照组,所有组织标本均经病理学检查确认。患者均已签署知情同意书,并经伦理委员会批准。

1.2 主要试剂 PCR 引物(北京六合华大基因科技有限公司),TRIZOL 试剂(Applied Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),逆转录试剂盒(PrimeScript RT-PCR kit; Takara Bio),FastStart Universal SYBR Green Master (Roche)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取及逆转录 按照说明书要求,使用 TRIZOL 提取膀胱癌组织及癌旁正常组织中的总 RNA,1 μg 总 RNA 在 20 μL 体系中应用逆转录试剂盒按照说明进行逆转录反应,将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱备用。

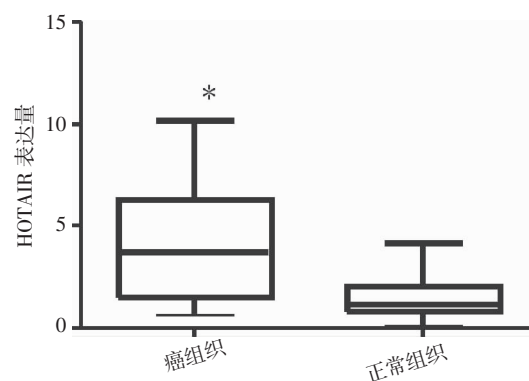
1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测膀胱癌组织及癌旁组织中 HOTAIR RNA 的表达 HOTAIR 上游引物:5'-CAGTGGGGAAGTCTGACTCG-3',下游引物:5'-GTGCCTGGTGCTCTCTTACC-3',产物长度 94 bp。GAPDH 上游引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3',产物长度 226 bp。按实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书,以 20 μL 反应体系进行扩增,阴性对照用 1 μL DEPC 处理的超纯水代替 cDNA 模板。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;45 个循环反应。实时荧光定量 PCR 结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析,所有实验均重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据管理和统计分析,癌组织及癌旁组织中 HOTAIR 的表达量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间表达差异分析采用 t 检验;定性资料采用 χ^2 检验;应用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-Rank 检验分析 HOTAIR 表达量与膀胱癌患者预后关系;采用 COX 比例风险回归模型分析膀胱癌患者预后的危险因素,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 膀胱癌组织与癌旁正常组织中 HOTAIR RNA 的表达情况 RT-PCR 结果显示,HOTAIR RNA 在 88 例膀胱癌组织中的表达量明显高于癌旁正常组

织,差异有统计学意义(4.026 ± 0.290 vs 1.424 ± 0.106 , $P<0.05$,图 1)。



* $P<0.05$

图 1 膀胱癌组织及癌旁正常组织中 HOTAIR RNA 的相对表达量

Fig 1 Relative level of HOTAIR in bladder cancer tissues and adjacent non-cancer tissues

2.2 膀胱癌组织中 HOTAIR RNA 表达量与临床病理关系 根据膀胱癌组织中的 HOTAIR RNA 的平均表达量确定膀胱癌组织中 HOTAIR RNA 的高低表达情况。采用 χ^2 检验分析 HOTAIR RNA 表达情况与膀胱癌临床病理指标相关性。高表达的 HOTAIR RNA 与病理分期($P<0.001$)、分级密切相关($P=0.001$),与患者年龄、性别、吸烟史、肿瘤大小没有相关性(表 1)。

表 1 癌组织中 HOTAIR 表达量与临床病理参数的关系

Tab 1 Association between HOTAIR expression and various clinicopathological factors of bladder cancer patients

临床病理参数		HOTAIR 表达情况/ n (%)			χ^2	P
		低表达	高表达	合计		
年龄	<65 岁	24(58.5)	17(41.5)	41	0.254	0.671
	≥ 65 岁	25(53.2)	22(46.8)	47		
性别	女	4(36.4)	7(63.6)	11	1.901	0.205
	男	45(58.4)	32(41.6)	77		
吸烟史	无	13(48.1)	14(51.9)	27	0.969	0.616
	已戒烟	20(60.6)	13(39.4)	33		
	未戒烟	16(57.1)	12(42.9)	28		
肿瘤大小	<3 cm	22(59.5)	15(40.5)	37	0.369	0.664
	≥ 3 cm	27(52.9)	24(47.1)	51		
肿瘤分期	Ta~T1	28(82.4)	6(17.6)	34	15.972	<0.001
	T2~T4	21(38.9)	33(61.1)	54		
肿瘤分级	低级别	14(87.5)	2(12.5)	16	11.213	0.001
	高级别	35(48.6)	37(51.4)	72		

2.3 HOTAIR RNA 表达量对膀胱癌患者生存时间的影响 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析膀胱癌组织中 HOTAIR RNA 表达情况对膀胱癌患者 5 年

生存率的影响, HOTAIR RNA 高表达组膀胱癌患者 5 年生存率低于 HOTAIR RNA 低表达组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$, Log-Rank 检验, 图 2)。进一步通过 COX 比例风险回归分析模型分析了与膀胱癌患者预后相关的影响因素: 单因素分析显示, 病理分期, HOTAIR 的表达水平为影响膀胱癌患者 5 年生存率的危险因素; 多因素分析显示, 膀胱癌组织中 HOTAIR 的表达水平, 可以作为膀胱癌患者 5 年生存率的独立预测因子(表 2)。

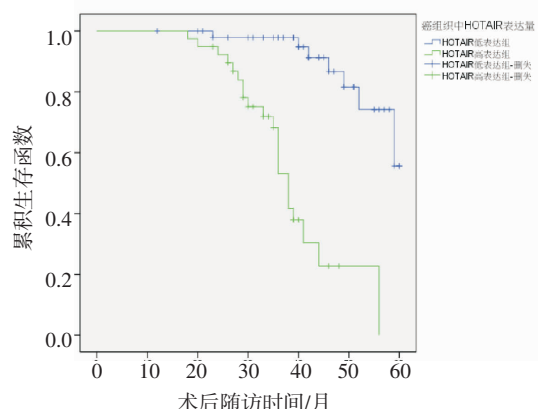


图 2 膀胱癌不同 HOTAIR 表达组患者生存率

Fig 2 The overall survival rate of patients estimated according to the HOTAIR expression level in bladder cancer patients

表 2 COX 比例风险模型分析患者生存影响因素

Tab 2 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors with respect to 5-year overall survival of patients with bladder cancer

变量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
HOTAIR 表达	1.628	1.378-1.924	<0.001	1.370	1.132-1.657	0.001
年龄	1.452	0.690-3.056	0.326			
性别	0.787	0.271-2.282	0.659			
肿瘤大小	1.060	0.504-2.228	0.878			
吸烟史	1.074	0.679-1.700	0.759			
肿瘤分期	6.376	3.424-11.875	<0.001	3.644	1.841-7.211	<0.001
肿瘤分级	3.175	0.903-11.163	0.072			

3 讨论

基因表达的异常调控在肿瘤发生发展过程中起到了重要作用。一般情况下, 人类常染色体中几乎所有核苷酸都有转录现象^[10]。随着基因组测序计划的完成以及新一代深度测序技术的应用, 人们发现哺乳动物中多于 95% 的转录序列为非编码 RNA^[11]。lncRNA 是长度大于 200 bp 的非编码 RNA 分子, 与 microRNA 不同, lncRNA 研究尚处于起步阶段。越来越多的研究开始将 lncRNA 与疾病联系起来, 其表

达异常能够引起一系列疾病包括肿瘤的发生发展。HOTAIR 是 lncRNAs 的成员之一, 转录本长度为 2.2 kb, 定位在人类染色体 12q13.13 上的 HOXC 家族的 HOXC11 基因和 HOXC12 基因之间^[12]。在乳腺癌中研究发现, HOTAIR 在乳腺癌原发病灶及转移性病灶中高表达, 与乳腺癌的进展转移存在重要关系, 为预测乳腺癌患者生存率的独立危险因素^[9]。在肝癌、胃肠道间质瘤以及胰腺癌中亦发现了 HOTAIR 的表达明显升高, HOTAIR 表达水平与患者生存期呈负相关^[13-15]。

本研究通过 qRT-PCR 检测 HOTAIR 在膀胱癌组织及癌旁正常组织中的差异表达, 实验结果证实, 膀胱癌组织中 HOTAIR 的表达量明显高于癌旁正常组织; 结合临床病理相关数据进行统计分析, 发现膀胱癌组织中 HOTAIR 的表达量与膀胱癌高分期、分级密切相关, 而与患者年龄, 性别, 吸烟史, 肿瘤大小没有相关性。据此我们推测 HOTAIR 可能与膀胱癌的发生进展存在相关性。为了证实这一推测, 笔者采用 Kaplan-Meier 生存分析方法检验了不同 HOTAIR 表达组膀胱癌患者 5 年生存率的差异, HOTAIR 高表达组膀胱癌患者 5 年生存率明显低于 HOTAIR 低表达组, 差异具有明显的统计学意义。进一步的 COX 回归分析证实, 高表达的 HOTAIR 为膀胱癌不良预后的独立危险因子之一。本研究也检测了 Ta/T1 期膀胱癌患者中 HOTAIR 的表达情况, 发现 HOTAIR 高表达为膀胱癌复发的预测因素之一^[16]。笔者纳入的研究标本皆取自全膀胱切除患者组织标本, 其中 Ta/T1 期患者 34 例, T2-T4 期患者 54 例, 通过分析不同 HOTAIR 表达组患者 5 年生存率的差异, 进一步证实了 HOTAIR 对膀胱癌预后的提示作用。据此推测 HOTAIR 与膀胱癌的发生进展密切相关, 但其调控膀胱癌发生进展的具体机制尚不明确, 我们将进一步通过体外体内试验, 分析 HOTAIR 调控膀胱癌进展的具体机制。

膀胱癌临床病理分期分级对膀胱癌的治疗选择及预后判断具有重要的提示作用, 然而它们对于膀胱癌患者预后的提示、治疗方式的选择同时存在一定的局限性, 尤其是对于行膀胱癌电切的患者, 存在病理分期分级偏低的可能, 而且具有同样病理分期分级的患者, 预后也大不相同^[17]。笔者将进一步扩大研究的样本量, 在更多的样本中去验证 HOTAIR 表达量对膀胱癌患者预后的提示作用, 为膀胱癌的个体化治疗提供参考。

综上所述, 我们的研究证实 HOTAIR 在膀胱癌

(下转第 132 页)

疫状态,同时我们的研究进一步证实 FoxP3⁺Tregs 细胞可能与 HBV 感染慢性化有关。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13
- [2] 华忠, 顾锡炳, 汤琴, 等. 慢性乙型肝炎患者不同 HBV DNA 水平诱导细胞免疫不同及意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(22): 3718
- [3] 梁劲松, 邓鑫, 文彬, 梁娟英. 不同临床类型乙型肝炎患者淋巴细胞亚群的差异性分析[J]. 医学研究杂志, 2015, 2: 75
- [4] 田瑛, 邱志峰, 李太生. 慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎病毒携带者外周血 T 细胞亚群的变化和意义[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(47): 3354
- [5] 裴豪, 印永祥, 陆以农, 等. 慢性乙肝患者肝组织内 CD4⁺、CD8⁺和 CD25⁺T 淋巴细胞的表达和研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(06): 412
- [6] Trautmann T, Kozik J H, Carambia A, et al. CD4⁺T-cell help is required for effective CD8⁺T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice[J]. PLoS One 2014, 9(1): e86348
- [7] 张敏, 杨丽莎, 彭德珍, 等. 慢性 HBV 感染不同免疫状态及乙型肝炎肝硬化外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(20): 3233
- [8] Chen M L, Pittet M J, Gorelik L. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8⁺T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(2): 419
- [9] Stoop J N, van der Molen R G, Baan C C, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 41(4): 771
- [10] Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, et al. Depletion of CD25⁺CD4⁺T cells (Tregs) enhanced the HBV-specific CD8⁺T cell response primed by DNA immunization[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24): 3772
- [11] 巫翠萍, 覃西, 王华民, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 与 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的相关研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(03): 273
- [12] Sprengers D, van der Molen R G, Kusters J G, et al. Different composition of intrahepatic lymphocytes in the immune-tolerance and immune-clearance phase of chronic hepatitis B[J]. J Med Virol, 2006, 78(5): 561
- [13] 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 等. HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(13): 1529

(2015-10-12 收稿)

(上接第 128 页)

组织中高表达, 高表达的 HOTAIR 与膀胱癌病理分期、分级密切相关, 可以作为膀胱癌恶性程度判断的辅助指标, 高表达的 HOTAIR 可以作为膀胱癌预后监测重要分子标志物。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 310(9): 982
- [2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 89
- [3] van Rhijn B W, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy[J]. Eur Urol, 2009, 56(3): 430
- [4] Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013 [J]. Eur Urol, 2013, 64(4): 639
- [5] Yeung C, Dinh T, Lee J. The health economics of bladder Cancer: an updated review of the published literature[J]. Pharmacoeconomics, 2014, 32(11): 1093
- [6] Kaufman D S, Shipley W, Feldman A S. Bladder cancer[J]. Lancet, 2009, 374(9685): 239
- [7] Jacobs B L, Lee C T, Montie J E. Bladder cancer in 2010 how far have we come[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244
- [8] Cheetham S W, Gruhl F, Mattick J S, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. Br J cancer, 2013, 108(12): 2419
- [9] 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(7291): 1071
- [10] ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos J A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project[J]. Nature, 2007, 447(7146): 799
- [11] Pennisi E. Shining a light on the genome's 'dark matter' [J]. Science, 2010, 330(6011): 1614
- [12] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7): 1311
- [13] Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, et al. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 946
- [14] Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1126
- [15] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic Cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(13): 1616
- [16] Yan T H, Lu S W, Huang Y Q, et al. Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 10249
- [17] Hussain S A, James N D. Molecular markers in bladder cancer[J]. Semin Radiat Oncol, 2005, 15(1): 3

(2015-09-16 修稿)