

长链非编码 RNA HOTAIR 在胃肠间质瘤中的表达特点及其意义

叶 静, 朱阿考, 张方捷, 金慧成

(杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘 要: [目的] 研究长链非编码 RNA HOTAIR 在胃肠间质瘤中的表达特点以及临床病理意义, 并分析与胃肠间质瘤患者预后的关系。[方法] 应用实时定量 PCR 检测 59 例胃肠间质瘤肿瘤标本中 HOTAIR 表达水平, 分析胃肠间质瘤中 HOTAIR 表达水平与肿瘤危险程度、核分裂相以及预后之间的相关性。[结果] 胃肠道间质瘤中 HOTAIR 表达与肿瘤危险程度、核分裂相、肿瘤多发呈明显相关, HOTAIR 高、低表达组 2 年生存率分别为 96.0%、69.2%, 两组比较差异有统计学意义 ($P=0.024$)。[结论] 长链非编码 RNA HOTAIR 与胃肠间质瘤肿瘤恶性程度和预后有关; HOTAIR 作为抑癌非编码基因有望成为胃肠间质瘤诊断以及预后判断的重要指标。

关键词: 长链非编码 RNA; HOTAIR; 胃肠间质瘤

中图分类号: R735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)05-0380-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.05.B009

Expression of Long Non-coding RNA HOTAIR and Its Significance in Gastrointestinal Stromal Tumors

YE Jing, ZHU A-kao, ZHANG Fang-jie, et al.

(Hangzhou First Municipal People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of long non-coding RNA HOTAIR and its clinicopathological significance in gastrointestinal stromal tumor (GIST). [Methods] The expression levels of HOTAIR in 59 GIST samples were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), and the correlation of HOTAIR expression with cancer risk grade, mitotic count and prognosis was analyzed. [Results] The expression of HOTAIR was significantly correlated with cancer risk grade, mitotic count and multiple tumors. The 2-year survival rate in patients with high HOTAIR expression was significantly higher than those with low HOTAIR expression (96.0% and 69.2%, $P=0.024$). [Conclusion] Long non-coding RNA HOTAIR is correlated with malignant degree and prognosis of GIST, indicating that it may be used for diagnosis and prognosis of GIST.

Subject words: long non-coding RNA; HOTAIR; gastrointestinal stromal tumor

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是消化系统最常见的间叶源性肿瘤, 起源于 Cajal 间质细胞, 组织学上多由梭形细胞、上皮样细胞、偶或多形性细胞, 排列成束状或弥漫状图像。主要发生于胃和小肠, 偶有发生于肠系膜、腹膜后或网膜等组织, 约占全部胃肠道恶性肿瘤的 1%~3%^[1]。

继 microRNA 之后, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的发现再次推动了非编码 RNA 研究领域的进展。LncRNA 可能通过染色质修饰复合体来影响表观遗传学状态, 并传递多个肿瘤进展和转移所需要的表型。而且, lncRNA 可能是癌基因和抑癌基因调控网络中的关键结点。HOX 转录反义 RNA (HOX transcription antisense RNA, HOTAIR) 是第 1 个已知的通过反式作用调节基因表达的 lncRNA, 是由 HOXC 基因座的反义链转录的, 主要调控 HOXD 基因, HOTAIR 能与多种染色质修饰

基金项目: 浙江省卫生厅一般项目 A 类 (2015118181)

通讯作者: 叶静, 副主任医师, 硕士; 浙江省杭州市第一人民医院普外科, 浙江省杭州市浣纱路 261 号 (310006); E-mail: yesuixufeng@hotmail.com

收稿日期: 2016-03-02; **修回日期:** 2016-04-15

酶一起共同调控基因表达,已有较多研究表明,HOTAIR在乳腺癌、结肠癌、肝癌和胰腺癌等多种肿瘤的发生、发展或转移等行为中扮演重要角色,并与预后相关^[2-5]。

然而,在GIST当中,HOTAIR的表达特点及作用机制目前尚未明确,本研究以GIST患者的组织标本为检测对象,采用实时定量PCR(qRT-PCR)的方法检测GIST瘤体组织HOTAIR表达,并通过分析其与临床病理特征以及与生存时间的关系,探讨其在GIST发生发展中的作用,以期作为GIST的基因诊断及治疗的新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2011年1月至2013年12月在杭州市第一人民医院普外科诊断并手术切除的初诊GIST患者作为研究对象,术后行常规病理检查并行CD117、CD34及S100免疫组织化学染色,CD117阴性的患者行DOG1免疫组化染色,同时在50高倍视野下观察核分裂相进行评判,共有59例确诊为GIST。其中男性36例,女性23例,年龄31~84岁,平均年龄(64.4±10.3)岁,中位年龄62岁;根据原发部位分为胃间质瘤30例,小肠间质瘤21例,结直肠间质瘤8例。59例中均无术前应用化疗药物或靶向药物进行辅助治疗,共17例患者术后曾接受伊马替尼药物治疗。临床诊断标准及危险度分级依据《中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013年版)》^[6]分为极低、低、中和高危组,分别为6、17、16和20例。相关临床及病理资料详见表1(Table 1)。59例病例均行外科手术切除,其中行局部肿瘤切除37例,行胃体或肠段部分切除(包括恶性肿瘤根治性手术)27例,手术标本在30min内取材并放入液氮中冷冻,随后转入-70℃冰箱长期保存,整个收集及保存过程均按照RNA-free原则操作。

1.2 HOTAIR 实时定量 RT-PCR

取100mg的冻存组织磨成粉末状加入1ml Trizol,静置5min后抽提RNA,细胞中抽提RNA时,每107个细胞中加入1ml Trizol。按照标准方法抽提总RNA,使用分光光度计测定RNA吸收值,并依此计算RNA浓度。逆转录按照Takara公司的Prime-

Script 逆转录试剂盒说明书逆转录成cDNA,-80℃保存备用。实时荧光定量PCR按照SYBRGreen试剂盒说明书配制反应体系。在Agilent 7700系列ICP-MS实时定量PCR系统进行qRT-PCR,定量PCR条件如下:90℃20s;90℃10s;50℃30s,共40个循环,每个样品重复3次,并行溶解曲线检测表达水平,以管家基因GAPDH作为内参对照计算HOTAIR相对丰度(HOTAIR/GAPDH)。引物序列如下:HOTAIR:(forward)5'-CAGTGGGGAAGTCTGACTCG-3';(reverse)5'-GTGCCTGGTGTCTCTTACC-3';GAPDH:(forward)5'-GTCAACGGATTTGGTCTGTATT-3';(reverse)5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'。

1.3 随访

出院后以门诊随访以及电话随访方式进行,末次随访时间为2015年12月,生存时间计算方法:自手术治疗之日至末次随访日或死亡的时间。

1.4 统计学处理

数据资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 17.0进行统计学处理,组间比较采用 χ^2 检验和Fisher精确概率法。Kaplan-Meier法计算生存率,生存率的比较采用Log-rank检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 实时定量 RT-PCR 检测 HOTAIR 在 GIST 中的表达水平

通过实时定量RT-PCR法检测59例GIST病例组织中HOTAIR的表达水平,并以管家基因GAPDH作为内参计算相对量,每例标本同时检测3次取平均值,结果59例HOTAIR/GAPDH总体表达水平为 0.00290 ± 0.00459 ,中位表达水平为0.0006。依据《中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013年版)》将59例病例分成极低危、低危、中等以及高危险度4种类型^[6],各组瘤体组织中HOTAIR/GAPDH相对表达水平分别为 0.00025 ± 0.00032 , 0.00050 ± 0.00049 , 0.00123 ± 0.00136 , 0.00710 ± 0.00586 (Table 1),其中中高危组HOTAIR表达水平显著高于极低、低危(0.00448 ± 0.00088 vs 0.00043 ± 0.00009 , $P = 0.0006$)(Figure 1)。进一步根据实体肿瘤宏观生长特点将59例GIST病例分成单发组($n = 48$)和多发组(11例),两组HOTAIR表达水平分别为 0.002 ± 0.00395

Table 1 HOTAIR expression in 59 cases with GIST

Parameters	N	HOTAIR/GAPDH
Gender		
Male	37	0.00376±0.00509
Female	22	0.00236±0.00504
Primary site		
Stomach	30	0.00291±0.00437
Small intestine	21	0.00262±0.00317
Colon	8	0.00395±0.00448
Risk grade		
Extremely low	6	0.00025±0.00032
Low	17	0.00050±0.00049
Medium	16	0.00123±0.00136
High	20	0.00710±0.00586
Solitary or multiple		
Solitary	48	0.00200±0.00395
Multiple	11	0.00798±0.00620
Mitotic count(/50HP)		
<5	41	0.00156±0.00290
≥5	18	0.00687±0.00624

和 0.00798±0.0062，多发组表达水平显著高于单发组($P=0.0006$)。同时根据核分裂相(50 高倍视野下)是否≥5 分组，核分裂相≥5 组 HOTAIR 相对表达水平显著高于<5 组 (0.00156±0.00290 vs 0.00687±0.00624, $P=0.0001$)(Table 1)。

2.2 病例随访结果

59 例病例中共有 51 例获得满 2 年随访，随访率 86.4%，中位随访时间 31 (19~48)个月。随访期

间，共 12 例患者出现肿瘤复发转移，其中腹腔局部复发 8 例，肝转移 2 例，多处复发及转移 2 例。共 9 例患者死亡，其中 8 例因肿瘤进展死亡，1 例死于心肌梗塞。

本研究中 51 例获得完整随访的 GIST 病例总体 2 年生存率为 82.4%。在 51 例完整随访病例中，将 HOTAIR 根据 HOTAIR/GAPDH 中位表达数(0.006)分成高表达组(>0.006,n=25)及低表达组(≤0.006,n=26),分别计算 2 年生存率。HOTAIR 高、低表达组 2 年生存率分别为 96.0%、69.2%，两组比较差异有统计学意义($P=0.024$)。

3 讨论

GIST 可以发生在自食管至肛门的胃肠道全长，其中最多见于胃(60%~70%)，其次为小肠(20%~30%)，十二指肠占 3%~5%，结肠及直肠为 5%~10%，食管<5%，胃肠道外间质瘤(EGIST)仅占 GIST 比例的 4%^[7]。

GIST 作为一种间叶来源肿瘤，不同危险程度治疗理念及方式差别较大，但临床鉴别 GIST 的良恶性十分困难，对预后的预测也十分有限，评价的标准也不一致。目前一般认为所有 GIST 均有潜在恶性倾向，应以其恶性潜能进行分级，分为极低度、低度、中度和高度 4 级。目前与 GIST 恶性度相关的因素

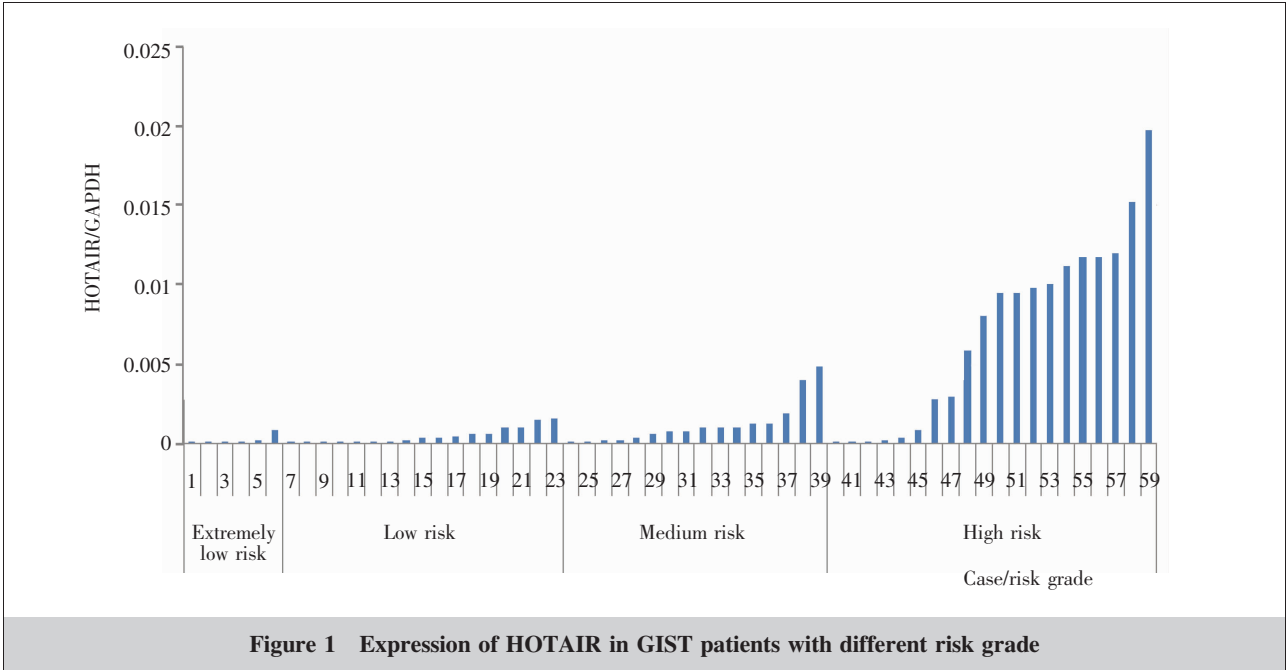


Figure 1 Expression of HOTAIR in GIST patients with different risk grade

有:细胞的有丝分裂指数(MI)、肿瘤大小、c-Kit 的突变、端粒酶活性、细胞构成、肿瘤位置以及肿瘤出血及坏死等指标,但仍无法满足对肿瘤性质、预后评判以及复发监测等方面的临床需要。另外,虽然分子靶向药物伊马替尼治疗 GIST 已经获得良好效果,但目前仍存在较多原发耐药及继发耐药病例,需要更深入的研究其机制及治疗靶点。

近年来研究表明 lncRNA 在肿瘤发生、发展中扮演了重要角色,如表观遗传变化、剪切调控、转录激活、转录干扰、核内外运输等^[8]。LncRNA HOTAIR 在乳腺癌、肺癌、胃癌等多种肿瘤中异常表达,针对其发挥的生物学功能及具体分子机制已有较深入的研究,如 Gupta 等^[9]发现 HOTAIR 在乳腺癌中表达显著上调,并证明与乳腺癌的侵袭转移、复发率及不良预后密切相关,并可作为预测乳腺癌转移与预后的有力指标。HOTAIR 能通过组蛋白甲基化抑制多种抑癌基因的表达从而参与肿瘤进展,与肿瘤的发生、发展、转移和预后密切相关,通过抑制 HOTAIR 的表达能显著抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力,并能增强细胞对常规化疗药物如顺铂、多柔比星的敏感性等,可以为肿瘤的个体化治疗及解决化疗耐药性方面提供依据和新的靶点^[2,10]。

本研究通过定量检测 59 例 GIST 病例瘤体组织中 HOTAIR 表达水平,结合临床病理特点分析发现,HOTAIR 相对表达水平与危险程度、肿瘤是否多发、核分裂相等明显相关,通过随访发现 HOTAIR 高表达提示不良预后。提示 HOTAIR 在 GIST 的发生发展中可能起到重要作用,可以为肿瘤诊断以及预后判断方面提供依据,但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Nilsson B, Bümming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era—a population-based study in western Sweden[J]. Cancer, 2005, 103(4): 821–829.
- [2] Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers [J]. Cancer Biol Med, 2015, 12(1): 1–9.
- [3] Li G, Zhang H, Wan X, et al. Long noncoding RNA plays a key role in metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 780521.
- [4] 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 Res, 2011, 71(20): 6320–6326.
- [5] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(13): 1616–1625.
- [6] CSCO Expert Committee of Gastrointestinal Stromal Tumor. Diagnosis and treatment consensus for gastrointestinal stromal tumor in China(2013 edition)[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2014, 17 (4): 393–398. [CSCO 胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗共识 (2013 年版). 中华胃肠外科杂志, 2014, 17(4): 393–398.]
- [7] Koch MR, Jagannathan JP, Shinagare AB. Imaging features of primary anorectal gastrointestinal stromal tumors with clinical and pathologic correlation [J]. Cancer Imaging, 2013, 12(3): 557–565.
- [8] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10 (3): 155–159.
- [9] 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.
- [10] Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: a novel oncogene[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 5611–5618.

启 事

每期杂志出版后,本刊都将给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册。如未能及时收到杂志,请登录 <http://www.chinaoncology.cn>

➡ 点击肿瘤学杂志

再点击

信息公告

MORE

查找 2016 年第 X 期《肿瘤学杂志》

杂志作者邮寄名单,按“挂号号”可在当地邮局查询。