

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217(2019)03-0243-04

前列腺癌血清中 lncRNA HOTAIR 的表达及临床意义研究

刘锐¹ 张鹏¹ 程龙¹ 徐振宇² 彭辉³

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1. 检验科; 2. 药学部; 3. 出入院管理科/重大疾病非编码 RNA 实验中心, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨前列腺癌血清中长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) HOTAIR 的表达和临床意义。方法: 收集经病理组织学确诊的前列腺癌患者血清样本 62 例, 正常体检对照血清样本 62 例, 采用 TRIzol LS 分离血清样本中的 RNA; 采用 qRT-PCR 法检测所有血清样本中 HOTAIR 的表达水平, 统计分析血清中 HOTAIR 水平与前列腺癌临床病理组织参数之间的关系。结果: 前列腺癌血清中 HOTAIR 表达水平高于正常对照组, 两组结果之间差异具有统计学意义($P < 0.01$), TNM III/IV 期的前列腺癌血清中 HOTAIR 的表达水平高于正常对照组($P < 0.05$), 且 III/IV 期前列腺癌血清中 HOTAIR 的表达水平高于 I/II 期的表达水平($P < 0.05$); 在有淋巴结转移的前列腺癌患者血清中, HOTAIR 的表达水平均高于无淋巴结转移患者($P = 0.006$); 血清中 HOTAIR 的表达值诊断前列腺癌的灵敏度为 69.4%, 特异度为 71.0%, 曲线下面积 0.709; 且血清中 HOTAIR 的表达与 PSA 值呈正相关($P < 0.001$, $r = 0.48$)。结论: 前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的表达水平升高, 提示 HOTAIR 可能参与了前列腺癌的发生发展进程。

【关键词】前列腺癌; 血清; 长链非编码 RNA; HOTAIR

【中图分类号】R 446.11; R 737.25 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.03.011

Expression and clinical significance of lncRNA HOTAIR in prostate cancer serum

LIU Rui, ZHANG Peng, CHENG Long, XU Zhenyu, PENG Hui

Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression level and clinical significance of long non-encoded lncRNA HOTAIR in prostate cancer. **Methods:** Sixty-two serum samples were collected from prostate cancer patients confirmed by histopathology, and another 62 serum samples were obtained from healthy subjects undergone general physical examination. Trizol LS reagent was used to isolate the total RNAs from the serum samples, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to measure the serum HOTAIR expression. Then the relationship between serum HOTAIR levels and clinical pathological parameters were statistically analyzed. **Results:** Serum HOTAIR levels were significantly increased in patients of prostate cancer compared with the control subjects ($P < 0.01$). Prostate cancer patients in TNM stage III/IV had significantly higher serum HOTAIR levels than the healthy subjects ($P < 0.05$), and the patients in TNM stage III/IV had higher serum levels of HOTAIR than those in TNM stage I/II ($P < 0.05$). Patients with lymph node metastasis had significantly higher serum of HOTAIR levels than those without lymph node metastasis ($P = 0.006$). The sensitivity and specificity by serum HOTAIR in the diagnosis of prostate cancer were 69.4% and 71.0% respectively. The area under the receiver-operating characteristic curve (AUC) was 0.709. Serum HOTAIR expression was positively correlated with PSA ($P < 0.001$, $r = 0.48$). **Conclusion:** The serum HOTAIR level can be significantly increased in patients with prostate cancer, suggesting that HOTAIR expression may be involved in the pathogenesis of prostate cancer.

【Key words】prostate cancer; serum; long non-coding RNA; HOTAIR

前列腺癌是一种常见的男性泌尿系统恶性肿瘤, 占所有男性肿瘤总发病率的第二位和病死率的第六位^[1]。在欧美国家的发病率高于亚洲国家, 但是近年来, 我国前列腺癌的发病率也在明显上升。

前列腺癌发现时多数分期偏晚, 肿瘤已经局部浸润或远处转移, 且低分化肿瘤所占比例更高^[2]。目前, 前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 仍然为临床常用的前列腺癌初筛、辅助诊断和

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2016A732); 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK2014F42)

收稿日期: 2018-11-09

作者简介: 刘锐 (1983-), 男, 主管检验师 (电话) 15955396237 (电子信箱) liumr_0518@163.com;

彭辉, 男, 主治医师 (电子信箱) phui.1234@163.com, 通信作者。

预后评估的分子标志物, 尽管 PSA 在中晚期前列腺癌血清中明显升高, 但对于早期前列腺癌的诊断, 其灵敏度及特异度较低, 已无法满足临床需求。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度 > 200 nt 的 ncRNAs 分子, 其本身不参与蛋白质的编码过程, 而是以 RNA 的形式通过表观遗传、转录和转录后的调控参与基因表达的调控^[3-4]。相关报道表明 lncRNA 可能为一类新的潜在肿瘤分子标志物, 如 HOTAIR^[5]、ncRUPAR^[6] 等。有研究发现, lncRNA-Hox 基因的反义基因间 RNA (Hox transcript antisense intergenic RNA, HOTAIR) 在前列腺癌组织中高表达, 且与前列腺癌的临床病理组织分期、淋巴结是否转移及预后有关^[7]。为了进一步研究 HOTAIR 在前列腺癌诊断及预后评估中的作用, 本研究通过检测前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的表达水平, 分析其与临床病理组织分期之间的关系, 并探讨其在前列腺癌临床诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例选自弋矶山医院 2015 年 1 月 ~ 2018 年 1 月, 经过组织病理学确诊的前列腺癌患者 62 例, 年龄 60 ~ 78 岁, 平均 (72 ± 5.3) 岁; TNM 分期: I 期 10 例, II 期 19 例, III 期 24 例, IV 期 9 例; 术前均未接受激素治疗、放化疗等抗肿瘤治疗。另选 62 例健康体检男性作为正常对照组。采集患者术前及对照组空腹静脉血 5 mL, 放置 30 min 后, 1000 r/min 离心 15 min, 吸取血清至无热原离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 分离血清至新的无热原离心管中, -80℃ 保存。本研究通过医院伦理委员会审核批准且征得所有研究对象的知情同意。

1.2 主要试剂 实验中所用 Trizol LS 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 Prime Script RT reagent kit 和 PCR 扩增试剂 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂购自大连 TaKaRa 公司; lncRNA HOTAIR 及内参基因 GAPDH 的引物由上海生工生物有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成 严格按照 TRIzol LS 试剂盒说明书提取所有血清中的总 RNA, 用 722 紫外分光光度计定量所提的 RNA 浓度及纯度, 要求总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.8 ~ 2.1 内, 用 DEPC 处理的无酶水溶解提取总 RNA, -80℃ 保存。采用逆转录试剂盒 Prime Script RT reagent kit 进行 cDNA 第一链合成, 具体如下: 加入 10 μL 60 mg/L RNA、3 μL 5 × g DNA 清洗缓冲液和 1 μL g DNA 清

洗液, 混匀后于 65℃ 反应 5 min, 冰上冷却, 离心收集上清, 依次加入 5 × Prime Script Enzyme Buffer 4 μL、Prime Script Enzyme 1 μL 以及 Prime Script RT Mix 1 μL 和 RNase free dH₂O 4 μL, 混匀, 35℃ 10 min、95℃ 5 min, 冰上冷却, 获得 cDNAs -20℃ 保存。

1.4 qRT-PCR 根据 GenBank 的 HOTAIR 全长基因序列, 应用 Premier 5.0 设计 HOTAIR 特异性的引物。HOTAIR 上游引物: 5'-CTTGCATCACATCTGC-CTATTTCGCATCG-3', HOTAIR 下游引物: 5'-ACAC-CATCACCAGACGACTCGTCAG-3'。GAPDH 上游引物: 5'-CCGTGTCATCAGCCTGAT-3', GAPDH 下游引物: 5'-GTCACGTAGCTCGTTAGGTA-3', 引物全部由上海生工生物有限公司合成。使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒, 以合成后的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 总反应体系为 20 μL, 以 GAPDH 作为内参照。反应条件为: 95℃ 反应 30 s, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 35 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析血清中 HOTAIR 的表达水平。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行处理和分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组血清 HOTAIR 表达水平差异性比较采用 *t* 检验, 不同 TNM 分期患者 HOTAIR 水平间差异采用方差分析, 组间比较采用 LSD 法; 绘制工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 评价血清中 HOTAIR 表达水平在前列腺癌诊断中的价值并进行分析; HOTAIR 的表达值与 PSA 值的相关性采用 Pearson 相关性分析。检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 前列腺癌患者血清中 lncRNA HOTAIR 的表达水平 采用实时定量 PCR 进行检测, 结果发现前列腺癌血清中 HOTAIR 相对表达量为 3.38 ± 2.15, 高于正常对照组 (2.21 ± 1.09), 差异有统计学意义 (*t* = 3.822, *P* < 0.01); 由工作特征曲线分析发现, 用于诊断前列腺癌, 当血清 HOTAIR 的相对表达量 > 2.35 时, 灵敏度为 69.4%, 特异度为 71.0%, 曲线下面积为 0.709 (图 1), 提示血清中 HOTAIR 的表达水平可能用于前列腺癌检测。

2.2 血清中 lncRNA HOTAIR 的表达水平与临床病理参数及 PSA 值的关系 为了明确 HOTAIR 的相对表达水平对于诊断前列腺癌的临床意义, 我们分析了前列腺癌血清中 HOTAIR 表达水平与患者病理参数的关系, 分析发现病理分期 TNM I 和 II 期前列腺癌血清中 HOTAIR 表达水平的差异无统计学意义 (*P* = 0.579), 而 III 期前列腺癌患者血清中 HOTAIR

水平高于 I 期和 II 期前列腺癌患者 (P 分别为 0.018 和 0.026), 且 IV 期前列腺癌患者血清中 HOTAIR 水平亦高于 I 期、II 期 ($P < 0.001$), 也高于 III 期患者 ($P = 0.002$) (表 1)。同时, 有淋巴结转移患者高于无转移的患者 ($P = 0.006$)。进一步分析比较血清中 HOTAIR 的相对表达水平与 PSA 值(化学发光法, AXSYMI 2000) 的相关性, 发现两者呈正相关 ($r = 0.48$, $P < 0.001$, 图 2)。

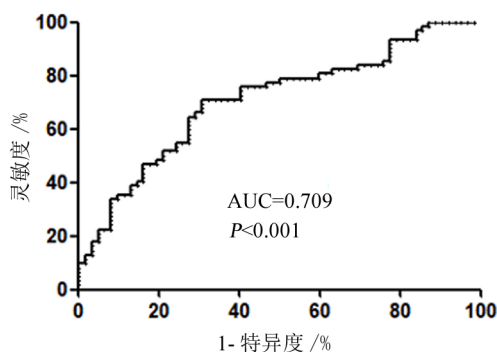


图 1 前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的灵敏度和特异度相关性分析

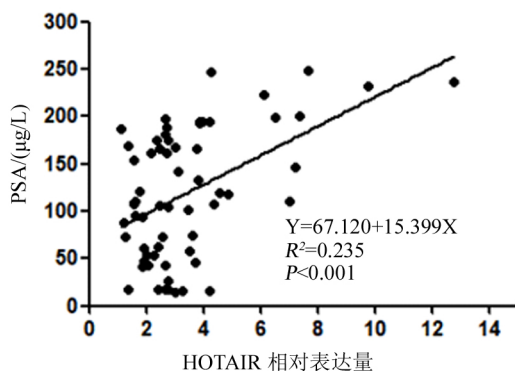


图 2 前列腺癌患者血清中 PSA 与 HOTAIR 表达值的相关性分析

表 1 前列腺癌血清中 HOTAIR 水平与临床病理参数关系

临床病理参数	n	HOTAIR	t/F	P
TNM 分期				
I	10	2.06 ± 0.83	10.106	<0.001
II	19	2.45 ± 0.91		
III	24	3.7 ± 1.66 ^{ab}		
IV	9	5.98 ± 3.56 ^{abc}		
淋巴结转移				
无	38	2.8 ± 1.36	2.858	0.006
有	24	4.32 ± 2.8		

注: a 表示与 I 期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), b 表示与 II 期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), c 表示与 III 期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

前列腺癌的发生具有多基因、多因素参与的特

点, 而各种调控基因在肿瘤的发生、发展进程中起着重要的作用。有研究发现 lncRNA 的表达水平失调与肿瘤的发病、浸润、转移以及预后相关^[8-10]。HOTAIR 为第一个被证实的有反式转录调控作用的 lncRNA, 基因定位于 HOXC (12q13.13; ref. 2) 位点, 充当“支架”作用, 基因全长 2364 bp, 其由 1 个长外显子和 5 个短外显子组成, 主要通过 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^[11]。多项研究发现 HOTAIR 在乳腺癌、食管癌、胃癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、淋巴瘤等肿瘤中高表达^[12-14]。由于 lncRNA 在不同肿瘤、不同组织部位中具有特异度高、稳定性高的特点, 且 lncRNA 在大多数心血管病和肿瘤患者的外周血循环中可以检出, 表明其有可能成为某些疾病诊治、预后判断的标志物^[15-16]。目前国内有关 HOTAIR 在前列腺癌发生、发展中的机制研究尚无报道。本研究采用实时定量 PCR 测量前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的表达水平, 结果显示前列腺癌血清中 HOTAIR 的表达水平高于对照组 ($P < 0.01$), 此结果与国外相关报道的研究结果一致^[17], 提示 HOTAIR 在前列腺癌病理发展过程中发挥一定作用。本研究的临床意义在于通过分析前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的表达水平, 可以对前列腺癌诊断、治疗及预后评估提供帮助。研究还进一步明确了前列腺癌患者血清中 HOTAIR 水平与临床病理资料之间的关系, 发现 III / IV 期前列腺癌患者血清中 HOTAIR 水平高于 I / II 期, 表明随着前列腺癌的恶性进展增高, HOTAIR 水平越高, 提示 HOTAIR 可能与前列腺癌的发生、TNM 分期及肿瘤负荷有关, 结果与国内外学者研究结果^[18-19]一致。本研究还发现前列腺癌血清中 HOTAIR 表达水平与是否有淋巴结转移有关, 在有淋巴结转移的前列腺癌血清中, HOTAIR 表达水平高于无淋巴结转移者, 结果提示 HOTAIR 可能参与了前列腺癌的侵袭转移过程; 而且工作特征曲线分析表明 HOTAIR 的表达水平对前列腺癌的诊断有较高灵敏度和特异度, 表明外周血循环中 HOTAIR 有望成为一种新的诊断前列腺癌分子标志物。实验结果还发现前列腺癌血清中 HOTAIR 的表达水平与 PSA 值呈正相关, 提示可以将血清中 HOTAIR 的表达值与 PSA 进行联合, 进而提高对前列腺癌诊断的准确性。

综上所述, 本研究发现前列腺癌患者血清中 HOTAIR 的表达水平高于正常对照组, 而且与前列腺癌病理 TNM 分期及有无淋巴结转移和 PSA 值紧密相关, 预示血清中 HOTAIR 的表达水平升高可能

与前列腺癌的发生、发展过程密切相关。如果在后期的其他多中心、大规模样本研究中得到进一步验证,血清 HOTAIR 表达水平有望用于前列腺癌的早期诊断、病情监测和预后评估等。因此,进一步深入研究 HOTAIR 在前列腺癌的发生发展过程中的作用机制,对于前列腺癌的临床诊疗和预后评估具有重要意义。

【参考文献】

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics [J]. A Cancer Journal for Clinicians 2016 66(1) : 7 - 30.
- [2] PEYROMAURE M È L, DEBRÉ B, MAO K *et al.* Management of prostate cancer in China: a multicenter report of 6 institutions [J]. The Journal of Urology 2005 174(5) : 1794 - 1797.
- [3] PAN JJ, XIE XJ, LI X *et al.* Long non-coding RNAs and drug resistance [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015 16(18) : 8067 - 8073.
- [4] LI Y, WANG X. Role of long noncoding RNAs in malignant disease (Review) [J]. Molecular Medicine Reports 2016 13(2) : 1463 - 1469.
- [5] LV XB, LIAN GY, WANG HR *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma progression and survival [J]. PLoS One 2013 8(5) : 3516 - 3522.
- [6] LIU L, YAN B, YANG Z *et al.* ncRuPAR inhibits gastric cancer progression by down-regulating protease-activated receptor-1 [J]. Tumour Biol 2014 35(8) : 7821 - 7829.
- [7] ZHANG A, ZHAO J C, KIM J *et al.* LncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer [J]. Cell Reports 2015 13(1) : 209 - 221.
- [8] GLOVER AR, ZHAO JT, JP JC *et al.* Long noncoding RNA profiles of adrenocortical cancer can be used to predict recurrence [J]. Endocr Relat Cancer 2015 22(1) : 99 - 109.
- [9] LIU B, SUN L, LIU Q *et al.* A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis [J]. Cancer Cell 2015 27(3) : 370 - 381.
- [10] HAN L, ZHANG EB, YIN DD *et al.* Low expression of long non-coding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of nonsmall cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bel-2 [J]. Cell Death Dis 2015 26(6) : 1665 - 1677.
- [11] VIERECK J, THUM T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury [J]. Circ Res 2017 120(2) : 381 - 399.
- [12] 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.
- [13] WANG L, ZOU X, BERGER AD *et al.* Increased expression of histone deacetylases (HDACs) and inhibition of prostate cancer growth and invasion by HDAC inhibitor SAHA [J]. Am J Transl Res 2009 1(1) : 62 - 71.
- [14] YU X, LI Z. Long non-coding RNA HOTAIR: a novel oncogene (Review) [J]. Mol Med Rep 2015 12(4) : 5611 - 5618.
- [15] HAJJARI M, SALAVATY A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers [J]. Cancer Biol Med 2015 12(1) : 1 - 9.
- [16] 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 [J]. Mol Med Rep 2016 13(6) : 5125 - 5131.
- [17] ZHANG A, ZHAO J C, KIM J *et al.* LncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer [J]. Cell Reports 2015 13(1) : 209 - 221.
- [18] LOEWEN G, JAYAWICKRAMARAJAH J, ZHUO Y *et al.* Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer [J]. J Hematol Oncol 2014 10(7) : 90 - 100.
- [19] LIU X H, 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 [J]. BMC Cancer 2013 8(13) : 464 - 474.