

lncRNA_HOTAIR 在宫颈癌组织及HeLa细胞中的表达及其生物学功能研究

叶岭¹, 吴涛²

(简阳市人民医院肿瘤科二¹、病理科², 四川 简阳 641400)

【摘要】 目的 探讨长链非编码RNA HOTAIR在宫颈癌组织中的表达及其生物学功能。方法 选取简阳市人民医院2014年8月至2016年7月收治并手术治疗的宫颈癌患者47例,采用实时荧光定量PCR检测患者癌组织及癌旁正常宫颈组织中HOTAIR RNA的相对表达量;以人宫颈癌Hela细胞为研究材料,应用小RNA干扰技术下调宫颈癌Hela癌细胞HOTAIR RNA表达,分别应用CCK-8实验、Wound Healing实验检测小干扰RNA下调HOTAIR表达前后Hela细胞增殖和迁移能力变化情况。**结果** HOTAIR在宫颈癌患者癌组织与癌旁正常宫颈组织中的相对表达量分别为(6.89±2.12)与(4.02±1.89),癌组织显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组细胞相比,外源性小干扰RNA可显著敲低Hela细胞中HOTAIR的表达并影响其增殖和迁移($P<0.05$)。**结论** 宫颈癌患者癌组织中HOTAIR表达水平高于癌旁正常宫颈上皮;HOTAIR可能参与了宫颈癌细胞增殖和迁移等生物学功能。

【关键词】 宫颈癌;长链非编码RNA;增殖;迁移;干扰RNA

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)14-2285-03

Long non-coding RNA HOTAIR expression in cervical cancer tissue and HeLa cells and its biology function. YE Ling¹, WU Tao². Second Department of Oncology¹, Department of Pathology², People's Hospital of Jianyang City, Jianyang 641400, Sichuan, CHINA

【Abstract】 Objective To discuss the long non-coding RNA HOTAIR expression in cervical cancer tissue, corresponding normal tissue and its biology function. **Methods** Forty-seven cervical cancer patients who received operation for cervical cancer were included in this study from Aug. 2014 to Jul. 2016. HOTAIR relative expression was tested by real-time PCR in the cancer tissue and corresponding normal tissue. HOTAIR was knock down in HeLa cells by small interfering RNA (shRNA). CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation ability, and the wound healing assay was used to detect the migration ability after inhibiting HOTAIR expression in HeLa cells. **Results** The relative HOTAIR expression in cervical cancer and normal tissue were (6.89±2.12) and (4.02±1.89), with statistically significant difference ($P<0.05$). shRNA_HOTAIR could successfully decrease HOTAIR expression in HeLa cells, and the proliferation and migration ability were inhibited by knocking down HOTAIR in HeLa cells compared to shRNA_control cell ($P<0.05$). **Conclusion** HOTAIR is highly expressed in cervical cancer tissue and plays important roles in the proliferation and migration of HeLa cell.

【Key words】 Cervical cancer; Long non-coding RNA; Proliferation; Migration; Small interfering RNA

通讯作者:叶岭。E-mail:yeling_jy@yeah.net

参考文献

[1] 游利.骨质疏松症的现状、筛查和预防[J]. 中国全科医学, 2016, 19(14): 1616-1619.

[2] 镐英杰, 于磊, 李志磊, 等. 自制椎弓根瞄准器引导T1椎体成形术9例报告[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(10): 1068-1070.

[3] 韩卫东, 黄爱军, 陈丽萍, 等. 注入骨水泥治疗胸腰椎骨质疏松性骨折: 成熟技术中的常见问题[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(26): 4912-4918.

[4] 钟远鸣, 程俊, 张家立, 等. 经皮穿刺椎体成形术治疗脊柱肿瘤疗效及安全性的Meta分析[J]. 中国全科医学, 2014, 17(33): 3974-3978.

[5] 张晓明, 马新英. 改良森田疗法对住院精神分裂症的康复效果评价[J]. 中国健康心理学杂志, 2014, 22(9): 1319-1320.

[6] 张伟, 杨惠杰. 麻醉苏醒室患者应用镇痛药物的观察分析及护理评价[J]. 中国卫生产业, 2014, 12(33): 93-95.

[7] 包欣南, 张乃东, 黄智慧, 等. 球囊扩张椎体成形治疗老年性骨质疏松性骨折的临床报告[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(24): 1890-1891.

[8] 方明, 陆建猛, 俞武良, 等. 椎体后凸成形术治疗伴裂隙征陈旧性椎体骨质疏松性骨折的疗效[J]. 中华老年医学杂志, 2014, 33(2): 175-178.

[9] 潘永谦, 李健, 杨波, 等. 经皮椎体成形术治疗不同程度骨质疏松椎体压缩性骨折的疗效分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2012, 14(3): 220-224.

[10] 史丽娜, 吴春根, 李文彬, 等. 椎体压缩性骨折MRI信号特点与PVP术后疗效相关性分析[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20(1): 32-36.

[11] 刘勇, 夏波, 李新福, 等. 椎体后凸成形骨水泥注入治疗脊柱转移瘤: 脊柱稳定性与疼痛的变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(16): 2484-2488.

[12] 刘佰易, 殷翔, 刘瑶瑶, 等. 经皮椎体成形术联合高粘度骨水泥治疗重度骨质疏松性椎体压缩骨折中的疗效[J]. 中华创伤杂志, 2016, 32(9): 794-798.

[13] 王忠平. 小剂量骨水泥注射对老年骨质疏松性椎体压缩骨折的疗效评价[J]. 医学综述, 2012, 18(17): 2892-2893.

(收稿日期:2017-02-10)

宫颈癌是妇科常见的实体恶性肿瘤之一,其好发年龄为 35~55 岁^[1]。流行病学研究证实,宫颈癌的发生与高危型乳头瘤病毒(HPV)感染存在明显的相关性^[2]。其他危险因素还包括多性伴侣、初次性生活较为年轻及早育等。早期非浸润性宫颈癌预后较好,远期生存率较高,但晚期患者发生淋巴转移者预后不良。目前,关于宫颈癌的发生发展、侵袭转移的确切机制并未完全阐明。随着分子生物学研究的不断深入,越来越多的研究发现表观遗传调控在宫颈癌的发生发展方面发挥重要作用。已有研究显示,HOTAIR 在多种实体肿瘤包括乳腺癌、肺癌及肠癌中呈现异常高表达,并与患者预后存在相关性^[3-4]。然而,HOTAIR 与人宫颈癌细胞生物学行为关系的研究鲜有报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 8 月至 2016 年 6 月简阳市人民医院 47 例手术切除宫颈癌标本(癌组织及癌旁组织)。纳入标准:(1)病理学明确诊断为宫颈癌;(2)患者术前未接受过新辅助化疗;(3)年龄大于 18 周岁;(4)组织学标本获取经家属签字,并经简阳市人民医院伦理委员会讨论通过。排除标准:(1)宫颈癌诊断不明确者;(2)术前接受新辅助化疗者;(3)合并其他恶性肿瘤者;(4) HIV 阳性患者。术中切除患者宫颈癌组织标本即可放入预先准备好的液氮中迅速冷冻,防治 RNA 降解,然后置入 -80 °C 冰箱保存待检。

1.2 主要试剂 Trizol 试剂,购自 Life Technologies 公司; DMEM 细胞培养基,购自 Gibco 公司; 10% 胎牛血清,购自 Gibco 公司; RNA 提取试剂盒,购自 TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒,购自 TaKaRa 公司; CCK-8 试剂盒,购自上海碧云天生物技术公司; 转染试剂 Lipofectamine2000,购自 Life Technologies 公司。Transwell 试剂盒,购自美国 BD 公司。针对 HOTAIR 的小干扰 RNA shRNA_HOTAIR 由吉玛公司合成。

1.3 细胞培养及转染 人宫颈癌 HeLa 细胞,购自中科院上海细胞库,在 5% CO₂ 的水套式培养箱中进行培养。HeLa 细胞密度在 80%~90% 时,用 0.05% 的胰酶进行消化传代,应用吉玛公司合成的 shRNA_HOTAIR 及对照 shRNA_control 进行转染,转染过程根据转染试剂操作说明进行。

1.4 qPCR 检测 HOTAIR 表达 提取癌组织、癌旁组织及宫颈癌 HeLa 细胞中的总 RNA,采用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,应用实时荧光定量 PCR 仪进行 HOTAIR 表达水平检测。对所得待测基因的

Ct 值进行校正,分别用待测基因 HOTAIR 的 Ct 值减去内参基因 GAPDH 的 Ct 值,代表待测基因的相对拷贝数, $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{待测基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$; 算出每组 $\Delta\Delta Ct$ 的平均值。

1.5 CCK-8 实验 将转染 shRNA_HOTAIR 及 shRNA_Control 的 HeLa 细胞按 5 000 个/孔接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔,于接种后 24 h、48 h、72 h 和 96 h,按照 CCK-8 试剂盒说明,检测细胞增殖。于 450 nm 波长处测定每组细胞的吸光度值。取 6 孔平均值为结果(A 值),以时间为横轴,A 值为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.6 Transwell 实验 应用无血清培养基重悬 5×10^4 左右 HeLa 细胞置入 Transwell 上室内,下室加入 600 μL 的含 10% 胎牛血清的培养基。37 °C 培养箱培养 48 h 后,100 倍镜下观察穿过 Transwell 小室的细胞数目,随机取 3 个视野,计算平均细胞数。

1.7 统计学方法 应用 STATA12.0 统计软件分析相关数据, RNA 表达水平等计量资料符合正态分布,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两样本均数 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOTAIR 在宫颈癌组织中表达 HOTAIR 在宫颈癌患者癌组织和癌旁正常宫颈组织中的相对表达量分别为 (6.89 ± 2.12) 和 (4.02 ± 1.89) ,癌组织显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义 ($t = 2.66, P < 0.05$),见图 1。

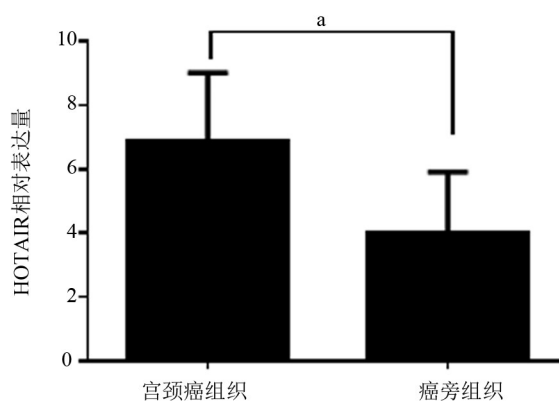


图 1 癌组织与癌旁组织中 HOTAIR 相对表达量比较
注:两组比较, $*P < 0.05$ 。

2.2 HOTAIR 与宫颈癌细胞增殖侵袭能力 与对照组细胞比较,小干扰 RNA 可显著下调 HOTAIR 在 HeLa 细胞中的表达水平,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2A; 下调后宫颈癌 HeLa 细胞中 HOTAIR 表达后,细胞增殖能力明显降低,见图 2B; 细胞迁移能力也下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2C。

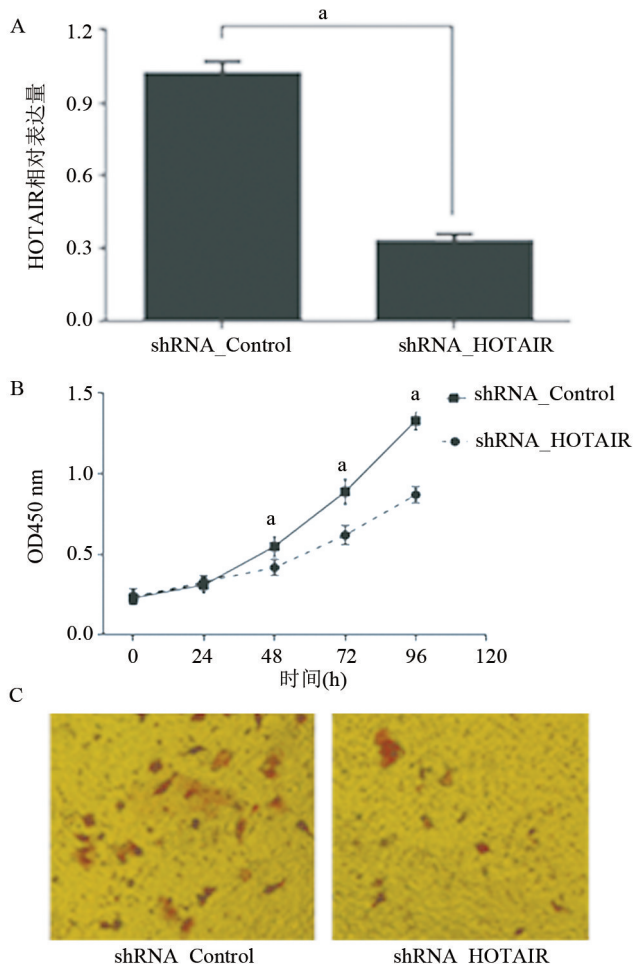


图2 下调宫颈癌Hela癌细胞HOTAIR后细胞增殖及迁移能力

注:A,小干扰RNA可显著下调HOTAIR在Hela细胞中的表达水平;B,下调后宫颈癌Hela细胞中HOTAIR表达后,细胞增殖能力明显降低;C,下调Hela细胞HOTAIR表达后穿膜细胞数目明显减少($\times 200$), $^*P < 0.05$ 。

3 讨论

长链非编码RNA是一类长度大于200 nt的RNA分子,由于此类RNA分子不具备开放阅读框,从而不能作为模板被进一步翻译成蛋白质而行使生物学功能^[5]。因此,在相当长的一段时间内,生物学界普遍认为此类RNA分子不具备任何生物学功能,只是DNA在转录过程中产生的“噪音”或“垃圾”。但近年来随着生物学技术及研究的不断深入和发展,越来越多的证据表明此类RNA分子不但不是“噪音”反而在细胞的分裂增殖、凋亡、转录激活及染色质修饰等多方面发挥着重要作用。HOTAIR为HOX基因转录反义RNA,是近年来发现的非编码RNA分子,其全长为2.2 kb,其转录本位于人12号染色体长臂13带13区^[6]。HOTAIR可作为骨架分子起到脚手架作用,导致不同靶基因特异性组蛋白修饰改变,从而导致如干基因沉默、促进乳腺癌转移^[7]。同时,在多种实体肿瘤中发现HOTAIR存在癌与正常组织的差异表达且这种差异与患者预后存在一定的关系。崔玲等^[8]采用实时荧光定

量PCR方法检测了44例卵巢癌组织及14例癌旁组织中HOTAIR的表达情况,结果发现其表达与肿瘤类型、分化程度存在相关性。Nakagawa等^[9]探讨了HOTAIR在肺癌转移中的作用,证实HOTAIR在晚期肺癌及肺癌转移患者中呈高表达。

关于HOTAIR在人宫颈癌中的表达情况及与宫颈癌Hela细胞增殖、侵袭能力关系的研究报道较少。郑婷华等^[10]探讨了HOTAIR与人宫颈癌Hela细胞凋亡的关系,研究结果认为下调Hela细胞中HOTAIR的表达,将导致Hela细胞凋亡比例增加细胞停滞于G₀/G₁期。而该研究未对HOTAIR与宫颈癌细胞侵袭能力进行研究。本研究中,HOTAIR在宫颈癌患者癌组织与癌旁组织中的相对表达量为(6.89 \pm 2.12)与(4.02 \pm 1.89),癌组织显著高于癌旁组织,这与张艳梅等^[11]的研究结果一致。癌组织与正常宫颈组织的差异表达提示HOTAIR在宫颈癌的发生发展中可能发挥着重要作用。shRNA下调HOTAIR,可影响Hela细胞增殖及迁移能力,说明HOTAIR在宫颈癌细胞的转移过程中发挥重要的表观遗传调控作用,但其作用机制是否与在乳腺癌细胞中相同,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] 乌恩奇,赵焕虎,刘微,等.中国不同地区宫颈癌中HPV亚型别分布数据横向比较分析[J].中华肿瘤防治杂志,2013,20(23): 1845-1851.
- [3] 王昌亮,王礼泉,林明臻,等.长链非编码RNA-HOTAIR与乳腺癌腋窝淋巴结转移相关性研究[J].中国医学创新,2015,12(2): 38-41.
- [4] 薛世民,贾娟,沈华.非小细胞肺癌组织中lncRNA HOTAIR的表达及临床意义[J].临床肿瘤学杂志,2016,21(9): 780-784.
- [5] Zhang H, Chen Z, Wang X, et al. Long non-coding RNA: a new player in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(3): 37-44.
- [6] Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: a novel oncogene (Review) [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(8): 5611-5618.
- [7] Woo CJ, Kingston RE. HOTAIR lifts noncoding RNAs to new levels [J]. Cell, 129(7): 1257-1257.
- [8] 崔玲,谢晓砚,王和,等.长链非编码RNA HOTAIR mRNA在卵巢癌中的表达[J].四川大学学报(医学版),2013,15(1): 57-59.
- [9] Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(2): 319-324.
- [10] 郑婷华,王茜,杨小杰,等.长链非编码RNA HOTAIR在宫颈癌患者组织及HeLa细胞中的表达和影响[J].基础医学与临床,2016,36(1): 94-98.
- [11] 张艳梅,陈晓忠.长链非编码RNA HOTAIR在宫颈癌中的表达及其对宫颈癌HeLa细胞增殖和凋亡的影响[J].肿瘤,2015,17(4): 446-452.

(收稿日期:2017-02-13)