

· 论 著 ·

# lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤中的表达及临床意义

孙青凤<sup>1</sup>, 郭宁宁<sup>2</sup>, 卢泽芬<sup>3</sup>, 陈保春<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 刘立峰<sup>1</sup>, 田龙江<sup>1</sup>

1. 沧州市人民医院泌尿外科, 河北 沧州 061000; 2. 沧州市中心医院内分泌科, 河北 沧州 061000;  
3. 沧州市人民医院内分泌科, 河北 沧州 061000

**摘要:** **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)HOX 基因的反义基因间 RNA(HOTAIR)在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中的表达及其临床意义。**方法** 采取实时定量荧光 PCR(qRT-PCR)法对 2009 年 9 月至 2012 年 3 月 85 例肾上腺嗜铬细胞瘤及 20 例正常肾上腺髓质组织中 lncRNA HOTAIR 表达水平进行检测,分析 lncRNA HOTAIR 表达与肾上腺嗜铬细胞瘤患者临床病理特征的关系,采用 Kaplan-Meier 生存曲线法分析 lncRNA HOTAIR 表达与患者预后的关系。**结果** qRT-PCR 结果显示,lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中表达水平显著高于正常肾上腺组织中[(5.01 ± 1.30) vs (0.92 ± 0.50),  $P < 0.01$ ]。在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中,lncRNA HOTAIR 表达水平在良恶性、肿瘤直径、是否远处转移方面有统计学差异( $P$  均  $< 0.01$ )。Log Rank 检验结果显示,lncRNA HOTAIR 高表达患者的生存时间较低表达者显著减少( $\chi^2 = 22.384, P < 0.01$ )。**结论** lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中高表达,其表达水平与肿瘤的良恶性、直径、远处转移有关,可作为肾上腺嗜铬细胞瘤的良性与恶性鉴定的指标,以及预后预测的潜在靶点。

**关键词:** 长链非编码 RNA; HOX 基因的反义基因间 RNA; 肾上腺嗜铬细胞瘤; 临床病理特征; 预后

**中图分类号:** R 692.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2018)02 - 0197 - 04

## Expression and clinical significance of lncRNA HOTAIR in patients with adrenal pheochromocytomas

SUN Qing-feng\*, GUO Ning-ning, LU Ze-fen, CHEN Bao-chun, WANG Hao, LIU Li-feng, TIAN Long-jiang

\* Department of Urology Surgery, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression level of HOX antisense intergenic RNA (HOTAIR), a long non-coding RNA (lncRNA), in the tissues of adrenal pheochromocytomas and its clinical significance. **Methods** Real time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of lncRNA HOTAIR in adrenal pheochromocytomas tissues of 85 cases and normal adrenal medullary tissue of 20 cases, and the association of lncRNA HOTAIR expression with clinicopathological features of adrenal pheochromocytomas patients was analyzed. The Kaplan-Meier survival curve was used to analyze the association of lncRNA HOTAIR expression with patients' prognosis.

**Results** qRT-PCR showed that the expression level of lncRNA HOTAIR in adrenal pheochromocytomas tissues was significantly higher than that in normal adrenal medullary tissues [(5.01 ± 1.30) vs (0.92 ± 0.50),  $P < 0.01$ ]. There were significant differences in expression level of lncRNA HOTAIR in adrenal pheochromocytomas tissues for benign or malignant, different tumor diameter, with or without distant metastasis (all  $P < 0.01$ ). Log Rank test showed that the survival time in high expression patients significantly reduced than that in lower expression patients ( $\chi^2 = 22.384, P < 0.01$ ). **Conclusions** lncRNA is highly expressed in adrenal pheochromocytomas and its expression level is associated with benign or malignant, tumor diameter and with or without distant metastasis. lncRNA HOTAIR can serve as an indicator of benign and malignant identification of adrenal pheochromocytoma and a potential target of predicting prognosis.

**Key words:** Long non-coding RNA; HOX antisense intergenic RNA; Adrenal pheochromocytomas; Clinicopathological features; Prognosis

嗜铬细胞瘤起源于交感神经系统细胞,临床上以高血压为主要症状,多发于肾上腺,少数发生在神经节丰富部位。肾上腺嗜铬细胞瘤起源于肾上腺髓质,目前,关于肾上腺嗜铬细胞瘤的发病机制尚不完全清楚<sup>[1]</sup>。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 nt 的单链 RNA 分子,本身并不编码蛋白质,而是以 RNA 的形式在表观遗传修饰、转录调控、转录后调控等多层面对基因表达进行调控<sup>[2]</sup>。研究表明,lncRNA 的异常表达与多种肿瘤的发生发展及预后密切相关。HOX 基因的反义基因间 RNA (HOX antisense intergenic RNA, HOTAIR) 是第一个被发现的 lncRNA,长度约为 2.2 kb,定位在人类 12q13.13 上 HOXC 位点,lncRNA HOTAIR 通过与 HOXC 基因簇共表达,在转录后水平调节多种基因的表达<sup>[3]</sup>。已有较多研究表明,lncRNA HOTAIR 的异常表达影响多种肿瘤,如乳腺癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、胃癌<sup>[6]</sup>和胰腺癌<sup>[7]</sup>的生存和预后。然而在肾上腺嗜铬细胞瘤中,lncRNA HOTAIR 的表达特点及作用机制目前尚未明确。

本研究以肾上腺嗜铬细胞瘤患者的组织标本为研究对象,采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 法检测肾上腺嗜铬细胞瘤组织中 lncRNA HOTAIR 表达情况,并通过分析其与临床病理特征及与患者生存时间的关系,探讨其在肾上腺嗜铬细胞瘤发生发展中的作用,以期作为肾上腺嗜铬细胞瘤的基因诊断及治疗的新靶点。

## 1 材料与方法

1.1 临床资料 2009 年 9 月至 2012 年 3 月收集入住本院的肾上腺嗜铬细胞瘤患者的手术标本 85 例,其中男 54 例,女 31 例,年龄 36 ~ 79 (57.47 ± 13.62) 岁,所有组织标本均经 HE 染色明确病理诊断;同期,收集健康志愿者的正常肾上腺髓质组织标本 20 例,其中男 12 例,女 8 例,年龄 34 ~ 81 (59.32 ± 11.22) 岁,两组研究对象的性别、年龄比较无统计学差异 ( $P$  均 > 0.05),具有可比性。所有患者均有完整的病历资料,签署知情同意书,并经医院伦理委员会审核同意。

1.2 qRT-PCR Trizol 法提取组织总 RNA (美国 Invitrogen 公司),按照 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 的说明书操作。紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司) 检测总 RNA 浓度及纯度,逆转录试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 进行逆转录,cDNA 产物置于 -20 °C 保存备用。qRT-PCR 引物序列 (南京

金斯瑞生物科技公司) 如下,lncRNA HOTAIR 正向引物 5'-3':GGT AGA AAA AGC AAC CAC GAA G,反向引物 3'-5':ACA TAA ACC TCT GTC TGT GAG TGC;内参 18S rRNA 正向引物 5'-3':AGG ACA TGC ATG GAC ACA GA,反向引物 3'-5':GGA CGG AAT CAA CTC TGA CA。定量 PCR 扩增仪 (ABI 7500,美国 ABI 公司) 检测 HOTAIR 表达水平。qRT-PCR 扩增体系为 10 μl,反应条件:50 °C,2 min;95 °C,10 min;95 °C,15 s;60 °C,1 min,进行 35 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法表示 lncRNA HOTAIR 相对表达量。

将肾上腺嗜铬细胞瘤患者分为 lncRNA HOTAIR 低表达组 (lncRNA HOTAIR 相对表达水平低于平均值的肾上腺嗜铬细胞瘤患者) 和 lncRNA HOTAIR 高表达组 (lncRNA HOTAIR 相对表达水平高于平均值的肾上腺嗜铬细胞瘤患者)。

1.3 随访 采用电话或者门诊的方式进行随访,随访时间为确诊后 1 ~ 60 个月,直至患者死亡或者随访时间截止。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的比较用  $t$  检验。两样本率的比较采用  $\chi^2$  检验。患者 5 年总生存率采用 Kaplan-Meier 生存曲线法,组间比较为 Log Rank 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 lncRNA HOTAIR 在不同组织中的表达比较 qRT-PCR 实验结果显示,肾上腺嗜铬细胞瘤组织中 lncRNA HOTAIR 相对表达量 (5.01 ± 1.30) 显著高于正常肾上腺髓质组织 (0.92 ± 0.50),差异有统计学意义 ( $t = 4.823, P = 0.000$ )。

2.2 lncRNA HOTAIR 表达与临床病理特征的关系 对 85 例肾上腺嗜铬细胞瘤患者癌组织中的 lncRNA HOTAIR 表达水平与临床病理特征进行分析发现,lncRNA HOTAIR 表达水平与肾上腺嗜铬细胞瘤的良恶性、肿瘤直径、有无远处转移有关 ( $P$  均 < 0.01)。而与患者性别、年龄、单发或多发、组织结构、有无包膜浸润、高血压表现类型无关 ( $P$  均 > 0.05)。见表 1。

2.3 lncRNA HOTAIR 表达与肾上腺嗜铬细胞瘤患者预后的关系 Kaplan-Meier 生存曲线结果显示,lncRNA HOTAIR 高表达的肾上腺嗜铬细胞瘤患者的 5 年总生存率 (12/51, 23.53%) 低于 lncRNA HOTAIR 低表达的肾上腺嗜铬细胞瘤患者 (18/34, 52.94%),差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.727, P = 0.005$ )。lncRNA HOTAIR 低表达组的生存时间为

(50.55 ± 2.35) 个月, 而 lncRNA HOTAIR 高表达组的生存时间为(33.67 ± 2.59) 个月, Log Rank 检验结果显示 lncRNA HOTAIR 高表达患者的生存时间较低表达患者显著减少 ( $\chi^2 = 22.384, P = 0.000$ )。见图 1。

表 1 lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中的表达水平与临床病理特征的关系 例(%)

临床病理参数	例数	低表达(n=34)	高表达(n=51)	$\chi^2$ 值	P 值
性别					
男	54	21(38.89)	33(61.11)	0.076	0.783
女	31	13(41.94)	18(58.06)		
年龄					
<55 岁	48	19(39.58)	29(60.42)	0.008	0.929
≥55 岁	37	15(40.54)	22(59.46)		
单发或多发					
单发	62	24(38.71)	38(61.29)	0.159	0.690
多发	23	10(43.48)	13(56.52)		
良性或恶性					
良性	19	14(73.68)	5(26.32)	11.568	0.001
恶性	66	20(30.30)	46(69.70)		
肿瘤直径					
≥5 cm	64	14(21.88)	50(78.13)	35.459	0.000
<5 cm	21	20(95.24)	1(4.76)		
组织结构					
小巢/梁状	32	15(46.88)	17(53.13)	2.225	0.329
大巢	28	12(42.86)	16(57.14)		
其他	25	7(28.00)	18(72.00)		
包膜浸润					
有	45	22(48.89)	23(51.11)	3.148	0.076
无	40	12(30.00)	28(70.00)		
远处转移					
有	66	16(24.24)	50(75.76)	30.548	0.000
无	19	18(94.74)	1(5.26)		
高血压表现类型					
持续性	43	21(48.84)	22(51.16)	2.832	0.092
阵发性	42	13(30.95)	29(69.05)		

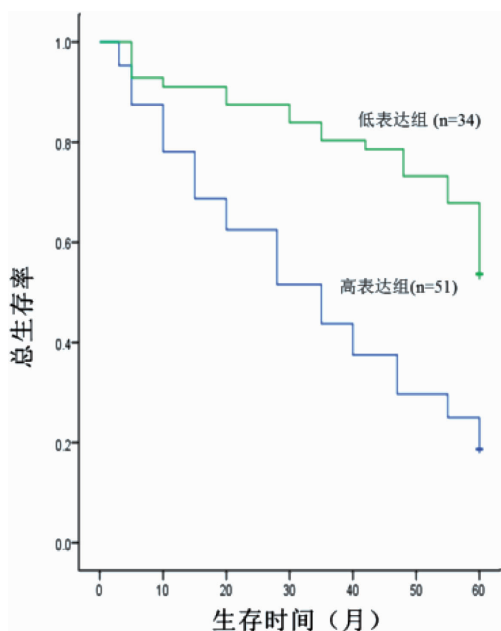


图 1 肾上腺嗜铬细胞瘤患者 lncRNA HOTAIR 高表达和低表达的生存曲线

### 3 讨论

DNA 组成元素 (encyclopedia element, ENCODE) 计划显示, 人类基因组中仅大约 2% 的基因能够编码蛋白质, 其余均为非编码 RNA<sup>[8]</sup>, lncRNA 是其中非常重要的一类, 可在转录及转录后水平调节基因表达, 在细胞分化、个体发育等多种生命活动过程中扮演重要角色<sup>[9]</sup>。lncRNA 异常表达与人类肿瘤密切相关<sup>[10]</sup>, 关于 lncRNA 在肿瘤中作用引起了研究者的广泛关注。本研究重点探讨 lncRNA HOTAIR 与肾上腺嗜铬细胞瘤的关系。

lncRNA HOTAIR 在肺癌、食管癌、结肠癌等<sup>[11-13]</sup> 多种肿瘤组织中表达上调, 参与基因表达调控和肿瘤进展过程, 如 lncRNA HOTAIR 可与多梳蛋白抑制复合物 2 (PRC2) 相互作用, 促进 PRC2 到达靶基因染色质区, 调节下游靶基因表达, 促进肝癌细胞侵袭转移<sup>[14]</sup>; 下调 lncRNA HOTAIR 表达能够抑制肾细胞癌的形成和肿瘤增殖<sup>[15]</sup>。

肾上腺嗜铬细胞瘤是肾上腺区较常见的肿瘤, 起源于肾上腺髓质, 临床表现主要有出汗、阵发性或持续性高血压、心悸、焦虑等<sup>[16]</sup>, 此外, 肾上腺嗜铬细胞瘤还可引起严重并发症, 如心力衰竭、心肌梗死等<sup>[17]</sup>, 对患者危害极大, 严重影响患者的生活质量和生命健康。研究显示, 良性肾上腺嗜铬细胞瘤的 5 年生存率大于 95%, 而恶性肾上腺嗜铬细胞瘤约为 44%<sup>[18]</sup>。与其他肿瘤不同, 良性与恶性嗜铬细胞瘤在临床症状、影像学、组织病理学等方面无特异性差异<sup>[19]</sup>, 寻找能够辨别良性与恶性肾上腺嗜铬细胞瘤的生物学指标是值得研究的问题。

本研究采用 qRT-PCR 法检测 lncRNA HOTAIR 在正常肾上腺髓质和肾上腺嗜铬细胞瘤组织中的表达, 结果显示, 在正常肾上腺髓质和嗜铬细胞瘤组织中均有 lncRNA HOTAIR 表达, 但嗜铬细胞瘤组织中 lncRNA HOTAIR 表达明显高于正常肾上腺髓质组织, 可以推测, lncRNA HOTAIR 的异常高表达参与并且促进了肾上腺嗜铬细胞瘤的形成。

目前临床上确诊恶性肾上腺嗜铬细胞瘤的金标准是在非嗜铬组织区域出现肿瘤转移病灶<sup>[20]</sup>, 但此时肿瘤多已进展至晚期, 临床治疗困难, 预后较差。除此之外, 肿瘤瘤体的大小是鉴别良性与恶性肾上腺嗜铬细胞瘤的重要参数, 本研究分析 lncRNA HOTAIR 与肾上腺嗜铬细胞瘤临床病理特征的关系, 结果显示, 在恶性肾上腺嗜铬细胞瘤组织中, lncRNA HOTAIR 高表达比例 (69.70%) 显著高于良性肾上腺嗜铬细胞瘤 (26.32%), 说明 lncRNA HOTAIR 在良

性与恶性肾上腺嗜铬细胞瘤中的表达存在显著性差异,提示 lncRNA HOTAIR 过度表达与该肿瘤的恶性病变有内在联系。与此同时,本研究发现,在肿瘤直径  $\geq 5$  cm 的肾上腺嗜铬细胞瘤组织中,存在远处转移的肾上腺嗜铬细胞瘤组织中,lncRNA HOTAIR 均具有较高的表达水平,以上结果进一步表明,检测 lncRNA HOTAIR 表达产物对良性与恶性肾上腺嗜铬细胞瘤有一定的鉴别意义。

Kaplan-Meier 生存曲线结果显示,肾上腺嗜铬细胞瘤患者中,lncRNA HOTAIR 高表达患者的 5 年总生存率显著低于 lncRNA HOTAIR 低表达患者,提示异常高表达 lncRNA HOTAIR 可能是导致肾上腺嗜铬细胞瘤患者预后不良,甚至死亡的原因之一。

综上所述,与正常肾上腺髓质组织相比,lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中异常高表达,且在恶性、肿瘤直径  $\geq 5$  cm、存在远处转移的肾上腺嗜铬细胞瘤组织中具有更高的表达水平,lncRNA HOTAIR 高表达患者的生存时间显著缩短,提示 lncRNA HOTAIR 可作为肾上腺嗜铬细胞瘤的良性与恶性鉴定以及预后预测的潜在靶点。

#### 参考文献

- [1] Mete O, Tischler AS, de Krijger R, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(2):182-188.
- [2] 杨韬,李俊堂,王丽娟,等. 干涉 lncRNAs HOTAIR 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(1):97-98.
- [3] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. Science, 2010, 329(5992):689-693.
- [4] Lu L, Zhu G, Zhang C, et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(3):875-883.
- [5] Yang Z, Zhou L, Wu LM, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(5):1243-1250.
- [6] Lee NK, Lee JH, Park CH, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes carcinogenesis and invasion of gastric adenocarcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(2):171-178.
- [7] 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):1616-1625.
- [8] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome[J]. Science, 2005, 309(5740):1559-1563.
- [9] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(1):7-21.
- [10] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4):452-463.
- [11] 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.
- [12] Chen FJ, Sun M, Li SQ, et al. Upregulation of the long non-coding RNA HOTAIR promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis[J]. Mol Carcinog, 2013, 52(11):908-915.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Wu Y, Liu J, Zheng Y, et al. Suppressed expression of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and tumorigenicity of renal carcinoma cells[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12):11887-11894.
- [16] Kim DW, Yoon SK, Kim SH, et al. Assessment of clinical and radiologic differences between small and large adrenal pheochromocytomas[J]. Clinical Imaging, 2017, 43:153-157.
- [17] Yu R, Nissen NN, Bannykh SI. Cardiac complications as initial manifestation of pheochromocytoma; frequency, outcome, and predictors[J]. Endocr Pract, 2012, 18(4):483-492.
- [18] 王钧. 嗜铬细胞瘤诊治现状和进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(27):2791-2793.
- [19] Strong VE, Kennedy T, Al-Ahmadie H, et al. Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis[J]. Surgery, 2008, 143(6):759-768.
- [20] Morikawa T, Suzuki M, Unno M, et al. Malignant pheochromocytoma with hepatic metastasis diagnosed 10 years after a resection of the primary incidentaloma adrenal lesion; report of a case[J]. Surg Today, 2001, 31(1):80-84.

收稿日期:2017-08-08 修回日期:2017-08-24 编辑:王宇