

## LncRNA-HOTTIP 对食管鳞癌细胞增殖和侵袭的影响

马 腾<sup>1,2</sup>, 赵 晔<sup>3</sup>, 邵永丰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>东南大学附属中大医院胸心外科, <sup>3</sup>消化内科, 江苏南京 210009)

**[摘要]** 目的: 探讨 HOXA 远端转录本 (HOXA transcript at the distal tip, HOTTIP) 在食管鳞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 组织中的表达及对食管癌细胞部分生物学行为的影响。方法: 采用逆转录-实时定量 PCR 法 (RT-qPCR) 检测 ESCC 组织及细胞中 HOTTIP 的表达水平; 通过 RNA 干扰技术将 si-HOTTIP 转入细胞中以降低 HOTTIP 的表达水平, 并通过定量 PCR 检测其干扰效率。用 CCK8 法和 Transwell 法检测敲除 HOTTIP 对细胞增殖能力和侵袭能力的影响。结果: 与癌旁组织相比, ESCC 组织中 HOTTIP 的表达明显升高; 与正常食管上皮细胞相比, ESCC 细胞中 HOTTIP 的表达明显升高。此外, 通过分析临床数据发现高表达的 HOTTIP 与肿瘤体积和淋巴结转移紧密相关。CCK8 和 transwell 实验显示, 在敲除 HOTTIP 后, Eca-109 和 TE-13 细胞的增殖和侵袭能力明显下降。结论: HOTTIP 在 ESCC 细胞的增殖和侵袭过程中具有相当重要的作用。

**[关键词]** 食管鳞癌; 长链非编码 RNA-HOTTIP; 细胞增殖; 细胞侵袭

**[中图分类号]** Q813; R735

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)08-947-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160810

## Silence of LncRNA-HOTTIP inhibits cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell cancer

Ma Teng<sup>1</sup>, Zhao Ye<sup>2</sup>, Shao Yongfeng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, <sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression level of HOXA transcript at the distal tip (HOTTIP) in esophageal squamous cell cancer (ESCC) tissues and cell lines and investigate the potential underlying molecular mechanism. **Methods:** qRT-PCR was used to determine the relative HOTTIP expression levels in ESCC tissues and cell lines. Small interfering RNA (si-HOTTIP) was transfected into ESCC cells to knock down HOTTIP expression. CCK-8 assay and Transwell assay were performed to evaluate the proliferation and invasion ability of ESCC cells. **Results:** Compared with controls, HOTTIP expression levels were significantly up-regulated in ESCC tissues and cell lines. Higher expression level of HOTTIP was found associated with larger tumor size and more lymph node metastasis. CCK-8 assay and Transwell assay showed that silence of HOTTIP inhibited the proliferation and invasion of Eca-109 and TE-13 cells *in vitro*. **Conclusion:** HOTTIP plays crucial role in proliferation and invasion of ESCC.

**[Key words]** esophageal squamous cell cancer; long noncoding RNA HOTTIP; proliferation; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 947-951]

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其中食管鳞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 发病率占我国食管癌总体发病率的 90% 以上<sup>[1]</sup>。尽管

医疗水平在不断提升, 但是由于缺少可靠的早期诊断标志物和抑制肿瘤转移的治疗靶标, 大部分 ESCC 患者就医时已出现淋巴结转移, 其 5 年生存率往往不足 10%<sup>[2]</sup>。因此, 针对 ESCC 细胞增殖和转移的分子机制研究, 寻找潜在的诊断标志和治疗靶点具有十分重大的临床意义。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一种不具备编码功能且

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金 (BK20151590); 江苏省六大人才高峰项目 (WSW-024)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yongfengshao@126.com

长度 > 200 nt 的 RNA,它在人类基因的翻译、转录、剪切、修饰等过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。研究表明, lncRNA 的异常表达与人类肿瘤的发生发展密切相关,其潜在的分子机制具有重大研究价值。HOXA 远端转录本 (HOXA transcript at the distal tip, HOTTIP) 是 HOXA 染色体 5' 端的一种 lncRNA, 定位于 7p15.2 上, 全长 3 764 nt<sup>[4]</sup>。有研究发现, 过表达的 HOTTIP 通过激活基因 HOXA13 促进肝癌细胞的增殖和转移, 并降低患者的总体生存率<sup>[5-6]</sup>。另有研究表明, HOTTIP 可通过调节 HOXA13 促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭转移<sup>[7]</sup>。但是, 目前对 HOTTIP 在 ESCC 中的功能及其机制知之甚少。本文旨在研究 HOTTIP 在 ESCC 组织及细胞中的表达情况, 初步探索其对 ESCC 细胞行为的影响, 进而为 ESCC 的诊治提供潜在的分子靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ESCC 细胞 Eca-109、TE-1、TE-13 和人食管上皮细胞 HEEC (上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)。RPMI1640 培养基、胎牛血清 (FBS) (Gibco 公司, 美国), RNA 抽提试剂 TRIzol 和逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本), HOTTIP 小干扰 RNA (si-HOTTIP) 和阴性对照 si-NC (上海吉玛公司), Lipofectamine2000 和 CCK8 试剂 (Invitrogen 公司, 美国), Matrigel 基质胶和 Transwell 小室 (BD 公司, 美国), 二甲基亚砜、结晶紫染液和 PBS (Hyclone 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床标本收集

收集 2014—2015 年南京医科大学第一附属医院 ESCC 患者新鲜手术切除标本 50 例, 其中男 25 例, 女 25 例, 年龄 51~72 岁, 中位年龄 64 岁。癌组织标本和癌旁组织标本于离体 30 min 内分别收集, 立即置于 -80℃ 超低温冰箱中保存。

#### 1.2.2 细胞培养与转染

Eca-109 和 TE-13 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中, 置于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中。对数生长期细胞接种于 6 孔板, 待其密度约 50% 时每孔加入 5 μL Lipofectamine2000 和 200 pmol si-HOTTIP 混合液。si-HOTTIP 序列为正义链: 5'-GCACAGA-GAUA AUGGCAAAUU-3'; 反义链: 5'-UUUGCCAU-UAUCUCUGUGCUU-3'。对照组加入与实验组等量的 Lipofectamine2000 和 阴性对照 si-NC。si-NC 序

列为正义链: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACG UTT-3'; 反义链: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

#### 1.2.3 逆转录-实时定量 PCR (RT-qPCR)

TRIzol 法提取组织及细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, Taqman 探针法检测组织及细胞中 HOTTIP 及内参 GAPDH 的表达量。HOTTIP 上游引物: 5'-CCTAAAGCCACGCTTCTTTG-3'; 下游引物: 5'-TGCAGGCTGGAGATCCTACT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ACCCAGAAGACTGTG GATG G-3'; 下游引物: 5'-TTCTAGACGGCAGGTCAG GT-3'。

#### 1.2.4 细胞增殖实验

将细胞按照 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔加入无血清培养基 100 μL。细胞贴壁后进行转染, 并在转染结束后 0、24、48、72 h 时间点进行 CCK8 检测。检测时每孔加入 CCK8 试剂 10 μL, 在培养箱内孵育 2 h 后测 450 nm 的吸光度值, 全程避光操作, 每组均重复 3 次。

#### 1.2.5 细胞侵袭实验

将 Matrigel 胶与无血清 RPMI1640 培养基按 1:5 比例稀释, 取 50 μL 稀释胶均匀铺于小室内凝固备用。取对数生长期的细胞消化并用无血清培养基重悬后加入小室内, 每个小室细胞数量为 2×10<sup>4</sup> 个。小室下层加入 700 μL 含 10% 胎牛血清的培养基, 于细胞培养箱中培养 24 h 后取出小室, 弃去培养基, PBS 清洗 2 次后用无水甲醇固定 20 min, 结晶紫染色剂常温染色 30 min, 用棉签擦去未穿膜细胞, 在显微镜下随机选取 5 个视野拍照计数。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件对结果进行数据分析, 计量资料以均数±相差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据比较采用 *t* 检验。将纳入研究的 50 例病例按照 ESCC 组织 HOTTIP 的相对表达量依次排序并分为两组, 表达量较高的 25 例为 HOTTIP 高表达组, 表达量较低的 25 例为 HOTTIP 低表达组。用卡方检验分别验证两组间临床一般情况及病理改变有无统计学差异, 验证内容包括患者的性别、年龄、吸烟史、肿瘤直径和淋巴结转移情况。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

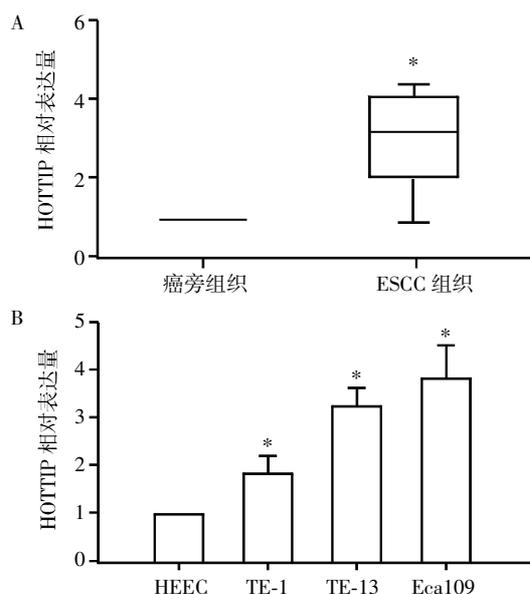
### 2.1 HOTTIP 高表达于 ESCC 组织和细胞

临床资料分析显示, HOTTIP 的表达水平与性别、年龄和吸烟史无明显关系, 而与肿瘤直径和局部淋巴结转移有显著的关联 (表 1)。经 RT-qPCR 检测,

HOTTIP 在 ESCC 组织中的表达量明显高于其在癌旁组织的表达量( $P < 0.05$ ,图 1A)。这些结果提示, HOTTIP 很可能起到了促进肿瘤生长和转移的作用。此外,本研究检测了 HOTTIP 在食管细胞系中的表达情况,结果显示,与人正常食管上皮细胞(HEEC)相比,HOTTIP 在 ESCC 细胞株 Eca-109、TE-1 和 TE-13 中的表达明显增高( $P < 0.05$ ,图 1B)。

表 1 ESCC 标本中 HOTTIP 表达量与临床情况的关系  
Table 1 The relationship between the expression of HOTTIP in ESCC tissue and clinical factors (n)

临床特征	HOTTIP 表达		P 值
	低(n=25)	高(n=25)	
性别			0.396
男	11	14	
女	14	11	
年龄			0.765
<60 岁	8	9	
≥60 岁	17	16	
吸烟史			0.370
无	18	15	
有	7	10	
肿瘤直径			0.016
<2 cm	9	2	
≥2 cm	16	23	
局部淋巴结转移			0.003
无	14	4	
有	11	21	



A: 与癌旁组织相比, \* $P < 0.05$  ( $n=50$ ); B: 与 HEEC 相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 1 HOTTIP 在食管组织和细胞系中的相对表达水平  
Figure 1 Expression levels of HOTTIP in esophageal tissue and cell lines

## 2.2 用 RNA 干扰技术可抑制 HOTTIP 在 ESCC 细胞中的表达

首先,本研究用 si-HOTTIP 干扰细胞中 HOTTIP 的表达,并用 RT-qPCR 进行干扰效率的检测。结果显示,与对照组相比,转染了 si-HOTTIP 质粒的 Eca-109 和 TE-13 细胞中的 HOTTIP 表达明显降低( $P < 0.001$ ,图 2)。该结果表明此 si-HOTTIP 可显著抑制该基因在 ESCC 细胞中的表达,该技术可用于后续实验对 HOTTIP 的敲除。

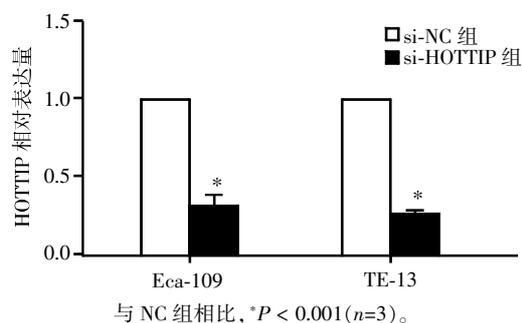


图 2 转染 si-HOTTIP 可显著降低细胞中 HOTTIP 表达水平  
Figure 2 si-HOTTIP suppresses the expression of HOTTIP in ESCC Cells

## 2.3 抑制 HOTTIP 表达,ESCC 细胞增殖减慢

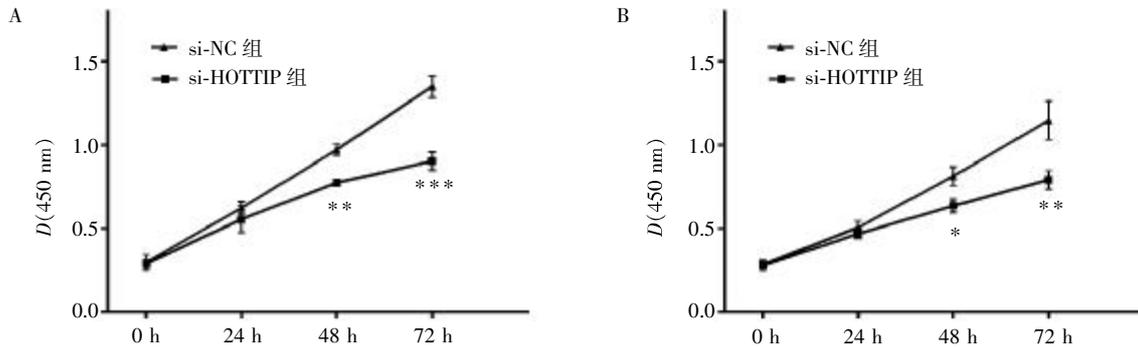
在 CCK8 增殖实验中,于 96 孔板内将 si-HOTTIP 和 si-NC 转染到 Eca-109 和 TE-13 细胞中,并于转染后 0、24、48、72 h 进行细胞相关数据的检测。实验数据显示,在 0 h 和 24 h 后,两组细胞的增殖能力没有明显差异;而在 48 h 和 72 h 后,两组细胞的增殖能力差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。在转染后 24 h,细胞内相关 RNA 表达水平即会有明显改变,而相应的蛋白质水平的变化则要经过 48 h 后才有可能出现。此结果提示, HOTTIP 很可能通过调控某种增殖相关蛋白质的表达水平而影响 ESCC 细胞的增殖功能。

## 2.4 抑制 HOTTIP 表达,ESCC 细胞侵袭能力减弱

在细胞侵袭实验中,转染了 si-HOTTIP 的 ESCC 细胞侵袭数远低于转染了 si-NC 的对照组。该实验结果表明,敲除 HOTTIP 的表达可显著抑制 ESCC 细胞的侵袭能力( $P < 0.05$ ,图 4)。

## 3 讨论

LncRNA 是一系列长度大于 200 nt 的非编码 RNA,由于不能直接编码产生蛋白质,它曾经一度被认为是遗传物质中无用的垃圾。随着技术的进步和各项研究的深入,科学界现普遍认定它在人类基因的翻译、转录、剪切、修饰等过程中发挥极其重要的作



A: Eca-109; B: TE-13. 与 NC 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

图 3 HOTTIP 沉默后可显著降低 ESCC 细胞的增殖能力

Figure 3 Knockdown of HOTTIP inhibits the proliferation of ESCC cells

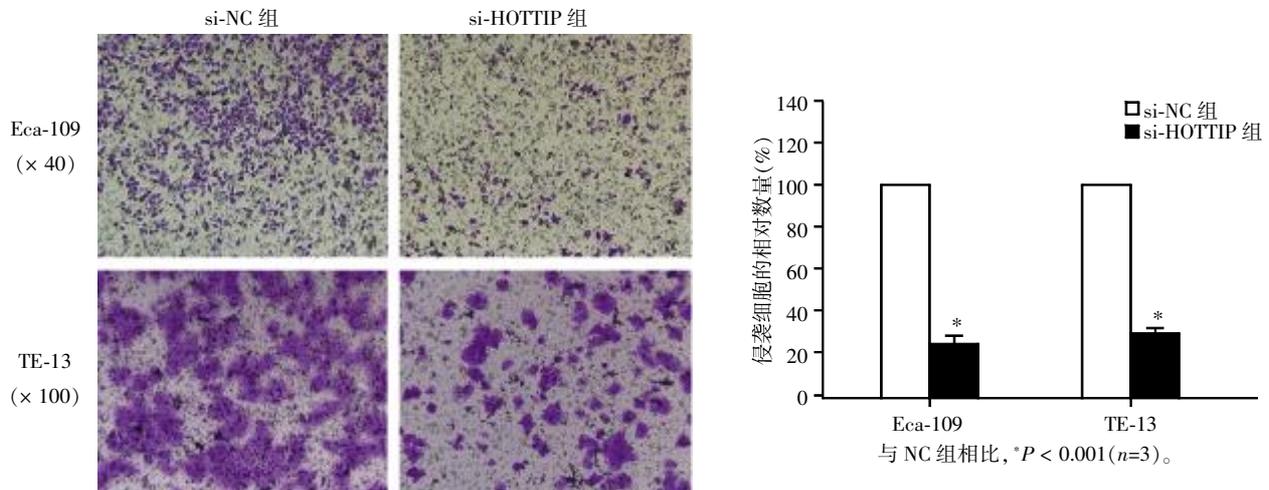


图 4 HOTTIP 沉默后可显著抑制 ESCC 细胞的侵袭能力

Figure 4 Knockdown of HOTTIP inhibits the invasion of ESCC cells

用,并与人体的生长发育和各种疾病的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。近年来,陆续有研究发现多种 lncRNA 失调可对各种恶性肿瘤产生重要的调控作用<sup>[8-10]</sup>。ESCC 作为世界常见的恶性肿瘤之一,亦受到了大量有关 lncRNA 的重点研究。Chen 等<sup>[11]</sup>通过对 78 组 ESCC 标本的研究发现, HOTAIR 显著高表达于 ESCC 组织,并与肿瘤的转移有正相关关系;抑制 HOTAIR 表达可显著降低 ESCC 细胞的侵袭转移能力,并增加细胞的早期凋亡率。Xu 等<sup>[12]</sup>检测了 62 对标本发现 TUG1 在 ESCC 组织中高表达,并与 ESCC 家族病史有关;在细胞中敲除 TUG1 的表达可明显抑制其增殖和转移,并影响正常的细胞周期进程。此外,Shafiee 等<sup>[13]</sup>证实, miR-21 可通过直接调节 lncRNA SOX2 使 ESCC 细胞进入周期阻滞,从而影响 ESCC 的发展进程。大量研究结果表明:lncRNA 是继 microRNA 之后又一种具有十分重大意义的非编码 RNA,它对各种基因表达的调节功能全面而强大,

对肿瘤发生发展的影响复杂而重要。

HOTTIP 首先被发现于人体末梢的成纤维细胞中,其表现为 HOXA 位点 5' 端终止子和启动子紧密相邻的环状基因结构。在胚胎发育阶段, HOTTIP 可促进 H3K4 的甲基化并进一步激活 HOX 基因的转录<sup>[14]</sup>。随后, Quagliata 等<sup>[6]</sup>通过对 52 组肝癌标本和 2 株肝癌细胞的研究证实, HOTTIP 的高度表达与肝癌转移和预后不良紧密相关。Zhang 等<sup>[15]</sup>通过研究发现, HOTTIP 在舌鳞癌组织中显著高表达,并与其 TNM 分期和不良预后有显著关联。此外, Lian 等<sup>[16]</sup>证实, HOTTIP 在结直肠癌中通过抑制 P21 蛋白的表达而促进细胞增殖并引发细胞 G0 期阻滞。这些已发表的文献一致认为 HOTTIP 在肿瘤的发生发展中起重要的促进作用,为针对 HOTTIP 的进一步深入研究打下了坚实的理论基础。然而,目前并没有任何已发表的研究涉及 HOTTIP 在 ESCC 中的表达和功能。鉴于 HOTTIP 在多种肿瘤中已知的显著致癌

作用,结合本课题组前期针对 ESCC 组织所做 lncRNA 芯片的结果(未发表资料),本文旨在研究并初步揭示 HOTTIP 在 ESCC 中的相对表达水平和部分生物学功能。

本研究发现,HOTTIP 在 ESCC 组织和细胞系中高表达,其表达水平与 ESCC 肿瘤大小和局部淋巴结转移呈正相关,转染特异性的 si-HOTTIP 可降低 ESCC 细胞 Eca-109 和 TE-13 中 HOTTIP 表达水平,低表达 HOTTIP 细胞的增殖和侵袭能力都受到了明显抑制。这些结果与上述已发表的 HOTTIP 在多种肿瘤中的表达水平和生物学功能相吻合,可信度较高。本研究所述 HOTTIP 对 ESCC 发生发展过程中的促癌作用具有重要的临床意义,为今后 ESCC 的准确诊断提供了潜在的分子标志物,为 ESCC 的靶向治疗提供了新的分子靶点。但是,HOTTIP 在 ESCC 发病过程中具体的作用途径和分子机制仍不清楚,这些都有待今后进一步探索和更深入的讨论。

#### [参考文献]

- [1] Torre LA,Bray F,Siegel RL,et al. Global cancer statistics,2012[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108
- [2] Demeester SR. Epidemiology and biology of esophageal cancer[J]. Gastrointest Cancer Res,2009,3 (2 Suppl): S2-S5
- [3] Ponting CP,Oliver PL,Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell,2009,136(4):629-641
- [4] Burgess DJ. Non-coding RNA:HOTTIP goes the distance [J]. Nat Rev Genet,2011,12(5):300
- [5] Tsang FH,Au SL,Wei L,et al. Long non-coding RNA HOTTIP is frequently up-regulated in hepatocellular carcinoma and is targeted by tumour suppressive miR-125b [J]. Liver Int,2015,35(5):1597-1606
- [6] Quagliata L,Matter MS,Piscuoglio S,et al. Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients[J]. Hepatology,2014,59(3):911-923
- [7] Li Z,Zhao X,Zhou Y,et al. The long non-coding RNA HOTTIP promotes progression and gemcitabine resistance by regulating HOXA13 in pancreatic cancer[J]. J Transl Med,2015,13:84
- [8] Lv W,Wang L,Lu J,et al. Long noncoding RNA KIAA0125 potentiates cell migration and invasion in gallbladder Cancer[J]. Biomed Res Int,2015,2015:108458
- [9] Shen L,Chen L,Wang Y,et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer[J]. J Neurooncol,2015,121(1):101-108
- [10] Xia Y,He Z,Liu B,et al. Downregulation of Meg3 enhances cisplatin resistance of lung cancer cells through activation of the WNT/beta-catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep,2015,12(3):4530-4537
- [11] 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
- [12] Xu Y,Wang J,Qiu M,et al. Upregulation of the long non-coding RNA TUG1 promotes proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Tumour Biol,2015,36(3):1643-1651
- [13] Shafiee M,Aleyasin SA,Vasei M,et al. Down-regulatory effects of miR-211 on long non-coding RNA SOX2OT and SOX2 genes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell J,2016,17(4):593-600
- [14] Wang KC,Yang YW,Liu B,et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression [J]. Nature,2011,472(7341):120-124
- [15] Zhang H,Zhao L,Wang YX,et al. Long non-coding RNA HOTTIP is correlated with progression and prognosis in tongue squamous cell carcinoma [J]. Tumour Biol,2015,36(11):8805-8809
- [16] Lian Y,Ding J,Zhang Z,et al. The long noncoding RNA HOXA transcript at the distal tip promotes colorectal cancer growth partially via silencing of p21 expression [J]. Tumour Biol,2016,37(6):7431-7440

[收稿日期] 2016-03-13