

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.005>

LncRNA HOTAIR 与 BRCA-1 在胃癌组织中的表达水平与顺铂化疗抵抗的影响

张伟, 尹晓东

(滨海县人民医院肿瘤科, 江苏 滨海 224500)

[摘要] 目的: 研究lncRNA HOTAIR与BRCA-1在胃癌组织中的表达水平与顺铂化学药物治疗(以下简称化疗)抵抗的相关性。方法: 选择2014年2月至2016年5月滨海县人民医院收治的胃癌根治术后并接受顺铂进行化疗的120例患者。采用实时定量PCR法检测所有患者胃癌组织、配对正常组织中lncRNA HOTAIR和BRCA-1的表达水平。比较患者胃癌组织与正常组织中lncRNA HOTAIR, BRCA-1表达水平, 分析lncRNA HOTAIR与BRCA-1的表达与顺铂化疗效果的相关性。结果: 在lncRNA组患者胃癌组织中lncRNA HOTAIR表达阳性者73例(60.8%), 相对表达水平为 7.63 ± 0.14 ; 在正常组织中lncRNA HOTAIR表达阳性者26例(21.7%), 相对表达水平为 2.32 ± 0.06 ; lncRNA HOTAIR表达阳性者使用顺铂化疗2年的无复发率为8.33%(10例), 阴性患者2年的无复发率为16.67%(20例)。在BRCA-1组患者胃癌组织中BRCA-1表达阳性者70例(58.3%), 相对表达水平为 15.39 ± 4.28 ; 在正常组织中BRCA-1表达阳性者4例(3.3%), 相对表达水平为 5.71 ± 2.13 ; BRCA-1表达阳性者使用顺铂化疗2年的无复发率为5.00%(6例), 阴性患者2年的无复发率为14.17%(17例)。结论: LncRNA HOTAIR及BRCA-1在胃癌组织中的表达量显著高于正常组织, 与顺铂化疗抵抗具有一定的关联性, 这两种标志物可作为胃癌患者术后化疗药物选择及预后判断的参考依据。

[关键词] 胃癌; 长链非编码RNA HOTAIR; 乳腺癌易感基因1; 顺铂化疗抵抗

Expression of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in gastric cancer and the effect of cisplatin resistance to chemotherapy

ZHANG Wei, YIN Xiaodong

(Department of Oncology, People's Hospital of Binhai County, Binhai Jiangsu 224500, China)

Abstract **Objective:** To study the correlation between the expression level of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in gastric cancer tissues and cisplatin chemotherapy resistance. **Methods:** A total of 120 patients who underwent radical surgery for gastric cancer and received cisplatin chemotherapy from February 2014 to May 2016 were enrolled. Real-time PCR was used to detect the expression levels of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in gastric cancer tissues and matched normal tissues of all patients. The expression levels of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in two tissues

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-19

通信作者 (Corresponding author): 尹晓东, Email: yinx2008@163.com

基金项目 (Foundation item): 盐城市科技计划项目 (YK2016114). This work was supported by Yancheng Science and Technology Plan Project Foundation, China (YK2016114).

were compared; and the correlation between the expression of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 and the effect of cisplatin chemotherapy was analyzed. **Results:** In the lncRNA group, the expression of lncRNA HOTAIR was 73 cases (60.8%), and the relative expression level was 7.63 ± 0.14 . In normal tissues, the expression of lncRNA HOTAIR was 26 cases (21.7%), the relative expression level was 2.32 ± 0.06 . Patients with positive expression of lncRNA HOTAIR had a recurrence rate of 8.33% (10 cases) with cisplatin chemotherapy for 2 years, and 16.67% (20 cases) of negative patients with 2 years. In the BRCA-1 group, the positive expression of BRCA-1 in gastric cancer tissues was 70 cases (58.3%) and the relative expression level was 15.39 ± 4.28 . The positive expression of BRCA-1 in normal tissues was 4 cases (3.3%) and the relative expression level was 5.71 ± 2.13 . The 2-year relapse-free rate of BRCA-1 expression patients treated with cisplatin chemotherapy was patients with positive BRCA-1 expression had a recurrence-free rate of 5.00% (6 cases) for 2 years with cisplatin chemotherapy and 14.17% (17 cases) for negative patients for 2 years. **Conclusion:** The expression levels of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in gastric cancer tissues are significantly higher than those in normal tissues, and have a certain correlation with cisplatin chemotherapy resistance. These two biomarkers can be used as reference for chemotherapy drug selection and prognosis in patients with gastric cancer.

Keywords gastric cancer; long chain non-coding RNA HOTAIR; breast cancer susceptibility gene 1; cisplatin chemotherapy resistance

胃癌(gastric carcinoma)是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,是最常见的消化道恶性肿瘤^[1]。全球每年约有100万人患胃癌,每年有近70多万人死于胃癌,而我国每年新增胃癌约36万,约占恶性肿瘤新发病例的20%,占全球胃癌发病人数的近一半^[2]。手术治疗是胃癌的主要治疗手段,临床研究^[3]显示术后使用化学药物,可以提高治疗效果,延长患者的生存周期。顺铂是胃癌手术后最常用的化学药物。长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)HOTAIR通过反式作用调节基因表达,研究^[4]表明其与结肠癌、乳腺癌及肝癌等多种恶性肿瘤的转移及预后密切相关。乳腺癌易感基因1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)是铂类所致细胞DNA损伤的修复基因,与顺铂抗肿瘤治疗的抗药密切相关^[5]。两者均为潜在的胃癌诊断及预后生物学指标,但鲜有关于化学药物治疗(以下简称化疗)相关性的研究。故本研究采用实时PCR法检测胃癌患者胃癌组织及配对正常组织中lncRNA HOTAIR与BRCA1的表达水平,并分析其与顺铂化疗抵抗的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2014年2月至2016年5月滨海县人民医院收治的胃癌根治术后接受顺铂进行化疗的120例患者。纳入标准:年龄>18岁;符合胃癌诊断标准;无化疗禁忌;能够口服药物;预计生存期>12周;

化疗前均知情并签署化疗同意书。排除标准:研究所用药物过敏;有近期相关治疗史;复发患者;合并其他脏器严重疾病和/或肿瘤。临床分期根据按第7版AJCC肿瘤分期标准进行,根据细胞形态和组织化学分类进行Lauren's分型。患者年龄33~78(中位57)岁,男81例,女39例,肿瘤分期66例I~II期、31例III期及23例IV期患者,肠型胃癌56例,弥漫型胃癌64例。所有患者在术后3~4周开始接受顺铂化疗,至少接受3个周期的化疗。本项目已获得滨海县人民医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

顺铂30 mg静脉滴注第1~4天,联合氟尿嘧啶0.75 g静脉滴注第1~5天。每3周重复,共4个周期。组织样品收集:取手术切除的胃癌及其相应的正常组织,分别剪碎后置于研钵中磨碎,加入Lysis Buffer混合均匀,其中正常组织距肿瘤边缘1~3 cm。总RNA提取和反转录:按照TRIzol试剂盒说明书,分别提取两组患者胃癌组织及正常组织中的总RNA,使用核酸蛋白仪测定总RNA的浓度,并鉴定总RNA的质量。根据分组,每个检测组取2 mg总RNA加入反转录反应体系进行反转录获得cDNA。实时定量PCR检测lncRNA HOTAIR及BRCA1的表达:各取2 μ L cDNA加入Sub Green PCR反应体系进行实时定量检测。相对表达量利用比较Ct值法计算,假定目标与内参序列扩增效率相同,则 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_q - \Delta Ct_{cb})$,其中q表示任意样本,cb表示内参。

1.3 随访方法和观察指标

电话随访患者的生存时间, 以2018年8月30日为随访截止时间, 以患者手术时间为生存时间的起点, 以患者疾病复发或死于癌症及癌症相关并发症为终点。截尾数据为失访、随访结束时患者仍然存活或死于与癌症无关的疾病。主要观察指标为无病生存率(disease-free survival, DFS)和总生存率(overall survival, OS), 采用Kaplan-Meier法计算, 使用Log-rank比较组间差异。

1.4 统计学处理

采用SPSS 16.0软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 行 t 检验; 计数资料用百分比表示, 行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织及正常组织 lncRNA HOTAIR 表达情况

实时PCR法检测全部患者胃癌组织及正常

组织中lncRNA HOTAIR表达情况发现: lnc RNA HOTAIR在胃癌组织中的表达水平显著高于配对正常组织(表1)。

2.2 患者化疗后的生存情况

66例I~II期、31例III期及23例IV期患者中lncRNA HOTAIR阳性表达患者2年的生存率显著低于阴性表达的患者(表2, 图1)。

2.3 患者胃癌组织及正常组织 BRCA-1 表达情况

实时定量PCR法检测患者胃癌组织及正常组织中表达情况发现: BRCA-1在胃癌组织中的表达水平显著高于配对正常组织(表3)。

2.4 患者化疗后的生存情况

66例I~II期、31例III期及23例IV期患者中BRCA-1组阳性表达患者2年的生存率显著低于阴性表达的患者(表4, 图2)。

表1 胃癌组织及正常组织lncRNA HOTAIR表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of lncRNA HOTAIR in gastric cancer tissues and normal tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	阳性患者/[例(%)]	阴性患者/[例(%)]	HOTAIR相对表达量
胃癌组织	120	73 (60.8)	47 (39.2)	7.63 ± 0.14
正常组织	120	26 (21.7)	94 (78.3)	2.32 ± 0.06
t/χ^2		37.980		381.893
<i>P</i>		<0.01		<0.01

表2 患者化疗后的生存情况

Table 2 Survival of patients after chemotherapy

分期	<i>n</i>	无复发/例	DFS/%	OS/%
I~II期				
HOTAIR阳性	38	6	9.68	19.35
HOTAIR阴性	28	13	19.35	29.03
<i>P</i>			0.02	0.01
III期				
HOTAIR阳性	20	4	11.76	17.65
HOTAIR阴性	11	5	17.65	23.53
<i>P</i>			0.05	0.03
IV期				
HOTAIR阳性	15	0	0.00	0.00
HOTAIR阴性	8	2	8.33	16.67
<i>P</i>			0.01	0.01

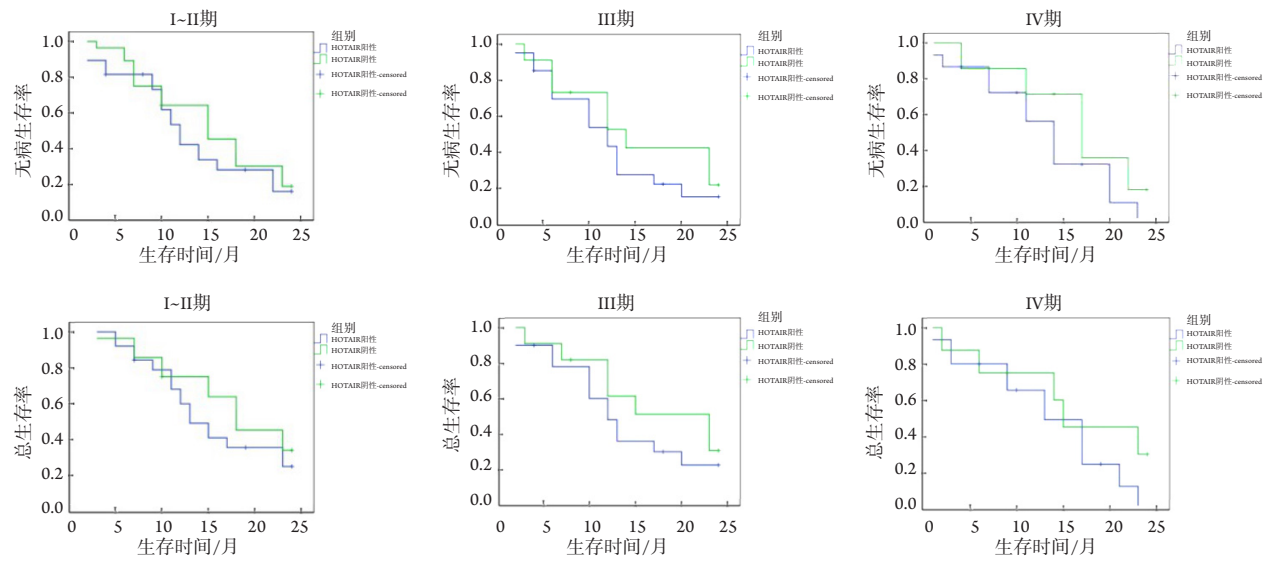


图1 胃癌患者不同HOTAIR表达的DFS曲线和OS曲线
Figure 1 DFS curve and OS curve of different HOTAIR expression in gastric cancer patients

表3 患者胃癌组织及正常组织BRCA-1表达情况(n=120)
Table 3 Expression of BRCA-1 in gastric cancer tissues and normal tissue (n=120)

组别	阳性患者/[例(%)]	阴性患者/[例(%)]	BRCA-1相对表达量
胃癌组织	70 (58.3)	50 (41.7)	15.39 ± 4.2
正常组织	4 (3.3)	116 (96.7)	5.71 ± 2.13
P	<0.01	<0.01	<0.01

表4 患者化疗后的生存情况
Table 4 Survival of patients after chemotherapy

分期	n	无复发 / 例	DFS/%	OS/%
I~II 期				
BRCA-1 阳性	39	4	6.45	19.35
BRCA-1 阴性	27	13	25.81	32.25
P			0.03	0.01
III 期				
BRCA-1 阳性	18	2	5.88	17.65
BRCA-1 阴性	13	4	11.76	23.53
P			0.02	0.02
IV 期				
BRCA-1 阳性	13	0	0.00	8.33
BRCA-1 阴性	10	0	0.00	16.67
P			—	0.04

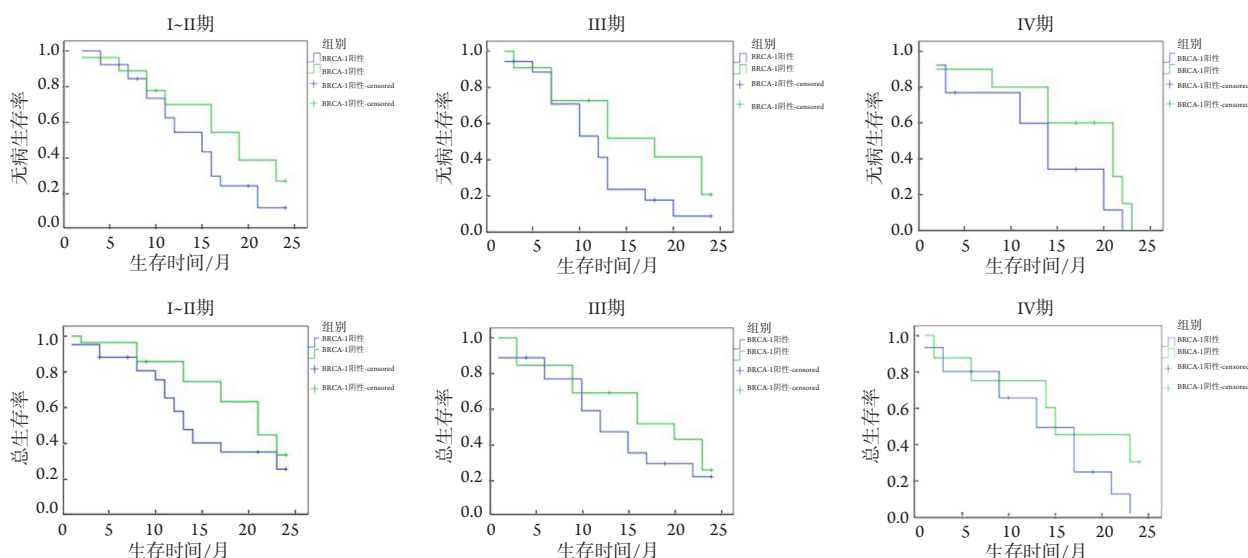


图2胃癌患者不同BRCA-1表达的DFS曲线和OS曲线

Figure 2 DFS curve and OS curve of different BRCA-1 expression in gastric cancer patients

2.5 Lnc RNA HOTAIR, BRCA-1 表达与临床病理参数之间的关系

按照不同项目和维度将患者病例资料再分组, 结果显示: lnc RNA HOTAIR, BRCA-1 的表达与性别、年龄、分化程度及病例类型均无相关性, 与肿瘤直径明显相关。

3 讨论

胃癌是我国发病率最高的消化道恶性肿瘤, 大部分患者是通过手术切除的方法来进行治疗, 术后联合使用化疗药物来达到彻底清除癌细胞的治疗效果^[6-7]。铂类药物是最常用的化疗药物之一, 胃癌患者术后的常用顺铂作为化疗药物^[8]。

近年来大量研究^[9-10]显示: lncRNA参与多种疾病的发生和发展, 特别是心脏疾病和肿瘤, 其在肿瘤发展的多种重要过程中起调控作用。有研究^[11-12]发现: lncRNA HOTAIR在临床标本中比较肿瘤原发灶、转移灶组织和正常组织中lncRNA HOTAIR的表达差异, lncRNA HOTAIR在肿瘤原发灶和转移灶组织中的表达显著高于正常组织, 且原发灶、转移灶组织高表达患者的无转移生存率和总生存率显著低于低表达者, 这表明lncRNA HOTAIR是肿瘤转移及患者生存率下降的危险因素之一。在胃癌研究中发现lncRNA HOTAIR在病变组织中异常表达, 与癌症发生、迁移和淋巴结转移密切相关, 但目前鲜有关于化疗抵抗的报道

^[12]。本研究选择lncRNA HOTAIR作为对象, 结果显示: 胃癌患者胃癌组织中lncRNA HOTAIR的表达水平显著的高于其对应的正常组织, 说明lncRNA HOTAIR在胃部肿瘤组织中高表达, 与上述研究结果一致。另外本研究还发现: lncRNA HOTAIR阳性表达患者使用顺铂化疗后2年无病生存率和总生存率显著低于lncRNA HOTAIR表达阴性患者, 这种现象在所有癌症分期中均有观察到, 推测lncRNA HOTAIR可能是导致顺铂化疗抵抗的危险因素之一。

BRCA1是一类抑癌基因, 定位于17号染色体, 编码乳腺癌易感类型1蛋白, 这种基因表达产物参与染色体损伤的修复, 在DNA双链断裂的无差错修复中起重要作用^[13-14]。本研究结果显示: 胃癌患者胃癌组织中BRCA1的表达水平显著高于其对应的正常组织, 说明BRCA1在胃部肿瘤组织中高表达, 与其在细胞中的作用一致。对比BRCA1阴、阳性表达患者使用顺铂化疗后2年无病生存率和总生存率后发现: BRCA1阳性患者两组指标均显著低于BRCA1表达阴性的患者。研究^[15]显示: BRCA1基因突变或发生功能缺陷会使肿瘤细胞对导致DNA断裂的化疗药物的敏感性增强, 引起铂类药物化疗效果下降。因此, BRCA1可能是导致顺铂化疗抵抗的危险因素之一。

虽然本研究发现lncRNA HOTAIR和BRCA1均可能是导致顺铂化疗抵抗的危险因素。但lncRNA HOTAIR本就是患者生存率下降的危险因素之一,

因此需要下一步实验证实其是否影响顺铂化疗抵抗。另外, 两者在胃癌组织中有较高的表达, 也可能是导致顺铂化疗抵抗发生的原因, 但由于生存率也受其他因素影响, 因而下一步也需要进行多因素分析以确定。

综上所述, lncRNA HOTAIR及BRCA1在胃癌组织中有较高的表达, 与顺铂化疗抵抗具有一定的关联性, 因此在胃癌患者术后化疗方案的制订中可考虑患者是否存在lncRNA HOTAIR及BRCA1的高表达, 对于高表达的患者可考虑使用其他类化疗药物。

参考文献

1. Nogueira C, Mota M, Rui G, et al. Prevalence and characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas in Portugal[J]. *Infect Agents Cancer*, 2017, 12(1): 41.
2. 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.
ZUO Tingting, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 44(1): 52-58.
3. 谢华夏, 徐志远, 郑国淀, 等. 槐耳清膏联合顺铂改变胃癌SGC7901细胞周期分布的实验研究[J]. *浙江医学*, 2017, 39(14): 1155-1157.
XIE Huaxia, XU Zhiyuan, ZHENG Guodian, et al. Combined effects of fungi Huaier extracts and cis-platin on cell cycle of human gastric cancer cell line SGC7901[J]. *Zhejiang Medical Journal*, 2017, 39(14): 1155-1157.
4. Berrondo C, Flax J, Kucherov V, et al. Expression of the long non-coding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147236.
5. Zámbrorsky J, Szikriszt B, Gervai JZ, et al. Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions[J]. *Oncogene*, 2017, 36(6): 746-755.
6. Ma J, Yao S, Li XS, et al. Neoadjuvant therapy of DOF regimen plus bevacizumab can increase surgical resection rate in locally advanced gastric cancer[J]. *Medicine*, 2015, 94(42): e1489.
7. Apicella M, Corso S, Giordano S. Targeted therapies for gastric cancer: Failures and hopes from clinical trials[J]. *Oncotarget*, 2015, 8(34): 57654-57669.
8. Xiaohong W, Feiqing Z, Xiuhai J, et al. The prognostic role of MAC30 in advanced gastric cancer patients receiving platinum-based chemotherapy[J]. *Future Oncol*, 2017, 13(29): 2691-2696.
9. Peng WX, Koirala P, Mo YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667.
10. Guan YX, Zhang ZM, Chen XZ, et al. LncRNA SNHG20 participated in proliferation, invasion and migration of breast cancer cells via miR-495[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 7971-7981.
11. Wang SH, Zhang MD, Wu XC, et al. Overexpression of LncRNA-ROR predicts a poor outcome in gallbladder cancer patients and promotes the tumor cells proliferation, migration, and invasion[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 1-9.
12. Sun Z, Wu XY, Wu CL. The association between LncRNA HOTAIR and cancer lymph node metastasis and distant metastasis: a meta-analysis[J]. *Neoplasma*, 2018, 65(2): 178-184.
13. Buchanan AH, Manickam K, Meyer MN, et al. Early cancer diagnoses through BRCA1/2 screening of unselected adult biobank participants[J]. *Genet Med*, 2018, 20(5): 554-558.
14. Shoko T, Manami D, Naoki I, et al. Mutations in BRCA1, BRCA2, and PALB2, and a panel of 50 cancer-associated genes in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8105.
15. 陈明聪, 薛洁浩, 江辉斌, 等. 切除修复交叉互补基因1和乳腺癌易感基因1多态性与非小细胞肺癌对铂类药物化疗敏感性及相关性分析[J]. *中国基层医药*, 2016, 23(16): 2401-2405.
CHEN Mingcong, XUE Jiehao, JIANG Huibin, et al. Correlation analysis of ERCC1 and BRCA1 gene polymorphism and non-small cell lung cancer platinum chemotherapy drugs sensitivity and chemotherapy prognosis[J]. *Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy*, 2016, 23(16): 2401-2405.

本文引用: 张伟, 尹晓东. LncRNA HOTAIR与BRCA-1在胃癌组织中的表达水平与顺铂化疗抵抗的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(2): 290-295. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.005

Cite this article as: ZHANG Wei, YIN Xiaodong. Expression of lncRNA HOTAIR and BRCA-1 in gastric cancer and the effect of cisplatin resistance to chemotherapy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(2): 290-295. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.005