

本文引用:张莉,伍靖,李晓宇.长链非编码RNA HOXA11-AS表达对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移和患者预后的影响[J].新乡医学院学报,2018,35(4):310-313. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.04.013.

【临床研究】

# 长链非编码RNA HOXA11-AS表达对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移和患者预后的影响

张莉,伍靖,李晓宇  
(深圳市龙华区人民医院口腔科,广东 深圳 518109)

**摘要:** **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌组织中的表达及其对患者预后和癌细胞迁移的影响。**方法** 利用The Cancer Genome Atlas(TCGA)可视化数据库Gene Expression Profiling Interactive Analyses(GEPIA)分析lncRNA HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌中的表达及其与患者预后的相关性。同时收集中南大学湘雅二医院口腔颌面外科2016年10月至2017年7月手术切除的24例头颈部鳞状细胞癌患者的癌组织和癌旁0.5 cm外正常组织,利用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测癌组织和癌旁组织中HOXA11-AS表达。取Tca8113细胞进行培养,待细胞生长至60%~70%融合时分2组,实验组加HOXA11-AS siRNA进行转染,对照组加阴性对照siRNA进行转染,然后采用qRT-PCR法检测2组细胞中HOXA11-AS的表达;采用Transwell细胞迁移实验检测2组细胞的迁移能力。**结果** 数据库分析结果显示,HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌组织中的表达高于正常组织( $P<0.01$ );HOXA11-AS表达与患者的总体生存率和无病生存率相关( $HR=1.5、1.6,P=0.043 0、0.039 0$ )。24例头颈部鳞状细胞癌组织和癌旁组织qRT-PCR检测结果显示,HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌组织和癌旁组织中的表达水平分别为 $2.58\pm0.37、0.95\pm0.29$ ,HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌组织中的表达明显高于癌旁组织( $P<0.05$ )。细胞实验结果显示,实验组和对照组Tca8113细胞中HOXA11-AS表达分别为 $0.43\pm0.05、1.08\pm0.07$ ;对照组和实验组穿过Transwell小室的细胞数目分别为 $212\pm15、113\pm9$ 个。实验组Tca8113细胞中HOXA11-AS表达低于对照组( $P<0.05$ )。实验组穿过Transwell小室的细胞数目明显少于对照组( $P<0.05$ )。**结论** HOXA11-AS在头颈部鳞状细胞癌组织中高表达,且其能促进头颈部鳞状细胞癌细胞的迁移,有望成为头颈部鳞状细胞癌治疗的新靶点。

**关键词:** 长链非编码RNA;HOXA11-AS;头颈部鳞状细胞癌;细胞迁移

**中图分类号:** R739.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)04-0310-04

## Effect of long non-coding RNA HOXA11-AS expression on the cell migration and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma patients

ZHANG Li, WU Jing, LI Xiao-yu  
(Department of Stomatology, the People's Hospital of Longhua of Shenzhen, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the long non-coding RNA (lncRNA) HOXA11-AS expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) and its effect on the cell migration and prognosis of HNSC patients. **Methods** The expression of lncRNA HOXA11-AS in HNSC and the correlation of HOXA11-AS expression with prognosis of patients was analyzed by The Cancer Genome Atlas (TCGA) visualization database Gene Expression Profiling Interactive Analyses (GEPIA). The cancer tissue and normal tissues of 0.5 cm outside the carcinoma of 24 HNSC patients in the Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University from October 2016 to March 2017 were collected. The expression of HOXA11-AS in the cancer tissue and paracancerous tissue was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Tca8113 cells were cultured. When the cells grew to 60% to 70% fusion, they were divided into two groups. The cells in experimental group was transfected with HOXA11-AS siRNA; the cell in control group was transfected with negative control siRNA; then the expression of HOXA11-AS in the two groups was detected by qRT-PCR; the migration ability of Tca8113 cells in the two groups was detected by transwell chamber assay. **Results** Database analysis results showed that the expression of HOXA11-AS in HNSC tissues was significantly higher than that in normal tissues ( $P<0.01$ ), and the high expression of HOXA11-AS was associated with the overall survival rate and disease-free survival rate of patients ( $HR=1.5、1.6,P=0.043 0、0.039 0$ ). The qRT-PCR result of 24 HNSC patients showed that the expression of HOXA11-AS in cancer tissue and paracancerous tissue was  $2.58\pm0.37、0.95\pm0.29$  respectively; the expression of HOXA11-AS in cancer

tissue was significantly higher than that in the paracancerous tissue ( $P < 0.05$ ). Cell experiment results showed that the expression of HOXA11-AS in Tca8113 cells in experimental group and control group was  $0.43 \pm 0.05, 1.08 \pm 0.07$  respectively; the number of cells passing through the Transwell chamber in the control group and experimental group was  $212 \pm 15, 113 \pm 9$ , respectively. The expression of HOXA11-AS in Tca8113 cells in experimental group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ); the number of cells passing through the Transwell chamber in the experimental group was significantly less than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression HOXA11-AS in HNSC is higher. And it can promote the migration of HNSC cells, which is expected to be a new target for the treatment of HNSC.

**Key words:** long non-coding RNA; prognosis; HOXA11-AS; head and neck squamous cell carcinoma; cell migration

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类含 200 ~ 100 000 个核苷酸, 无或很少编码蛋白质的 RNA 分子, 其在转录沉默、转录激活、染色质重塑、组蛋白修饰等多个方面参与基因的表达调控<sup>[1-2]</sup>。起初, lncRNA 一直被认为是基因组的“暗物质”, 不具有生物学功能。但是, 随着研究的深入, 人们逐渐认识到 lncRNA 参与了包括恶性肿瘤在内的多种疾病的发生、发展过程<sup>[3-5]</sup>。深入研究 lncRNA 的表达、功能和分子机制, 对于理解肿瘤等复杂疾病的发生发展机制, 寻找更加合适的诊断和治疗靶点具有重要意义。同源异型盒 11 反义 RNA (homeobox A11 antisense RNA, HOXA11-AS) 是一个定位在 HOXA11 基因反义 DNA 链上的 lncRNA, 转录本长度为 5.1 kb<sup>[6]</sup>。近年来, 已有多个研究团队发现, HOXA11-AS 在包括胃癌、结直肠癌、宫颈癌等肿瘤中差异表达, 可以作为这几种肿瘤的潜在生物学标志物<sup>[7-9]</sup>。但是, 截止目前, HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌中的表达情况及其作用尚无报道。本研究通过 Gene Expression Profiling Interactive Analyses (GEPIA) 数据库数据挖掘, 并检测 HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌组织中的表达, 来探究其对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移的影响, 以阐明 HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌进程中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 组织标本及细胞系** 收集中南大学湘雅二医院口腔颌面外科 2016 年 10 月至 2017 年 3 月手术切除的 24 例头颈部鳞状细胞癌组织及癌旁 0.5 cm 外正常组织 (癌旁组织) 标本, 其中男 17 例, 女 7 例; 年龄 26 ~ 61 ( $45.83 \pm 8.90$ ) 岁; 舌癌 14 例, 颊癌 10 例。所有病例经病理科确诊为鳞状细胞癌, 并取得患者的知情同意, 患者手术前均未接受过放射治疗和化学治疗。人头颈部鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 为中南大学湘雅医院医学科研中心馈赠。

**1.2 主要试剂与仪器** RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清、含乙二胺四乙酸 (ethylene-iaminetetraacetic acid, EDTA) 的胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂 TRIzol 购自瑞士罗氏公司, 反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (real time quantita-

tive polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒购自加拿大 Abm 公司, Hiperfect 脂质体转染试剂盒购自德国 Qiagen 公司, HOXA11-AS 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 及阴性对照 siRNA 购自苏州吉玛基因股份有限公司, PCR 引物购自上海生工生物工程有限公司; IQTM5 Multicolor Real-Time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司, CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Forma 公司, 超净工作台购自江苏安泰仪器公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 GEPIA 数据库数据挖掘** 首先, 在 GEPIA<sup>[10]</sup> 数据库中选择来源于 TCGA 数据库的所有头颈部鳞状细胞癌及正常组织的 RNA 测序数据, 以“HOXA11-AS”为检索词, 以  $P < 0.01$  为具有显著性差异, 分析其是否存在差异表达。然后以 HOXA11-AS 的表达从高到低进行排序, 前 25% 的样本为高表达样本, 后 25% 的样本为低表达样本, 分析其表达与患者总体生存率和无病生存率的关系。

**1.3.2 HOXA11-AS 表达的检测** 按照 TRIzol 试剂说明书上的步骤分别提取头颈部鳞状细胞癌组织、癌旁组织或者头颈部鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 的总 RNA。将提取完成的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性后, 测定总 RNA 浓度。然后, 采用 qRT-PCR 技术检测 HOXA11-AS 的表达 (根据反转录及 qRT-PCR 试剂盒说明书进行), 以  $\beta$ -Actin 为内参, 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

**1.3.3 细胞接种、转染及分组** 取头颈部鳞状细胞癌 Tca8113 细胞接种于含有体积分数 10% 胎牛血清和双抗的 RPMI-1640 培养基中, 在 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

取处于对数生长期的 Tca8113 细胞, 以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中。待细胞生长至 60% ~ 70% 融合时, 分为实验组和对照组。实验组细胞加 HOXA11-AS siRNA 进行转染 (按照 Hiperfect 脂质体转染试剂说明书进行), 对照组加阴性对照 siRNA 进行转染, 然后将细胞置于含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 48 h, 然后采用 qRT-PCR 法检测 2 组细胞中 HOXA11-AS 的表达。

**1.3.4 Transwell 小室迁移实验** 待 Tca8113 细胞

转染 siRNA 达到 24 h 后,胰蛋白酶消化细胞,无血清培养基洗涤细胞 2 次,并调整细胞浓度至  $10 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 。向 Transwell 小室下腔室中加入 800  $\mu\text{L}$  含体积分数 12% 胎牛血清的培养基,上室中加入 200  $\mu\text{L}$  上述细胞悬液,置于培养箱中培养 48 h。取出 Transwell 小室,生理盐水中清洗小室 2 遍,甲醛溶液固定细胞 30 min,清水洗涤小室 3 遍。加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  结晶紫室温染色 5 min,再用生理盐水洗去多余结晶紫,倒置显微镜下观察细胞染色情况,每个孔拍照 5 张并统计细胞数目。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌中的表达及其与患者预后的相关性** 数据库分析结果显示,HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌组织 ( $n = 519$ ) 中的表达较正常组织 ( $n = 44$ ) 中显著增高,是正常组织的 1.21 倍,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见图 1。HOXA11-AS 表达与患者的总体生存率和无病生存率相关,风险比 (hazard ratio, HR) 分别为 1.5 和 1.6,  $P$  值分别为 0.043 和 0.039,见图 2 和图 3。

**2.2 HOXA11-AS 在 24 例头颈部鳞状细胞癌中的表达** HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌组织和癌旁组织中的表达水平分别为  $2.58 \pm 0.37$ 、 $0.95 \pm 0.29$ ,头颈部鳞状细胞癌组织中的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

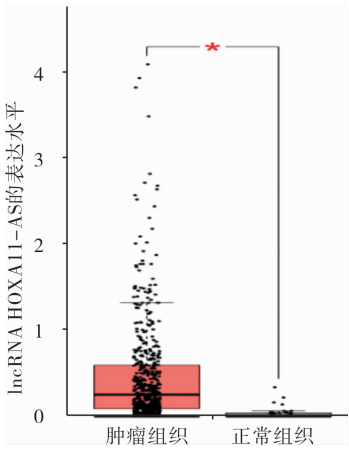


图 1 头颈部鳞状细胞癌组织及正常组织中 HOXA11-AS 表达

Fig.1 Expression of HOXA11-AS in the normal tissues and head and neck squamous cell carcinoma

**2.3 siRNA 对 HOXA11-AS 的沉默效果** HOXA11-AS 在实验组和对照组 Tca8113 细胞中的表达水平分别为  $0.43 \pm 0.05$ 、 $1.08 \pm 0.07$ ,实验组

Tca8113 细胞中 HOXA11-AS 表达低于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

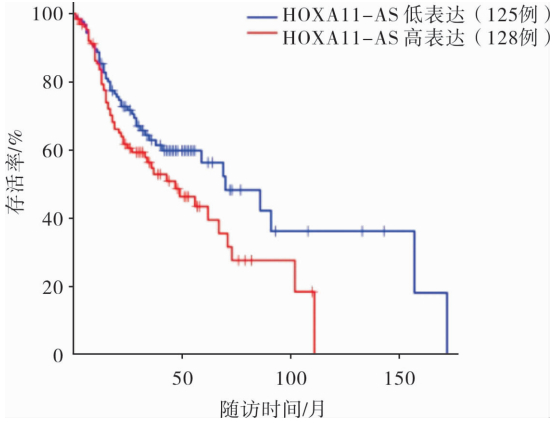


图 2 HOXA11-AS 表达与头颈部鳞状细胞癌患者总体生存率的关系

Fig.2 Relationship between the expression of HOXA11-AS and overall survival of head and neck squamous cell carcinoma patients

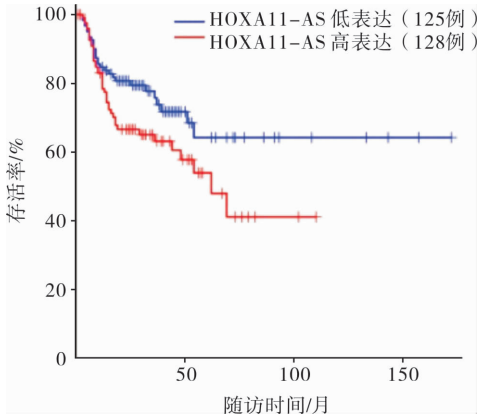
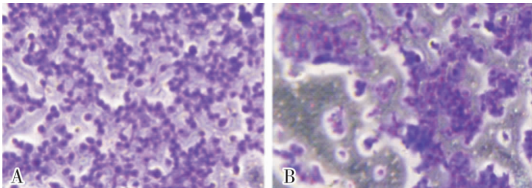


图 3 HOXA11-AS 表达与头颈部鳞状细胞癌患者无病生存率的关系

Fig.3 Relationship between the expression of HOXA11-AS and disease free survival of head and neck squamous cell carcinoma patients

**2.4 沉默 HOXA11-AS 表达对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移能力的影响** 对照组和实验组穿过 Transwell 小室的细胞数目分别为  $212 \pm 15$ 、 $113 \pm 9$  个。实验组穿过 Transwell 小室的细胞数目显著少于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4。



A:对照组;B:实验组。

图 4 HOXA11-AS 表达对 Tca8113 细胞迁移能力的影响  
Fig.4 Effect of HOXA11-AS on Tca8113 cells migration ability

3 讨论

lncRNA 是一组内源性、长度超过 200 nt、缺少特异完整的开放阅读框、无或很少有蛋白编码功能的 RNA 分子。其可作为功能蛋白质的信号、诱导、诱饵或支架分子等,在表观遗传水平、转录水平、翻译及翻译后水平等多层面调控基因的表达,参与肿瘤的发生、发展过程<sup>[11-12]</sup>。在头颈部肿瘤中以鼻咽癌中的功能性 lncRNA 报道较为多见。早在 2002 年,TAN 等<sup>[13]</sup>发现,鼻咽癌相关 lncRNA NAG7 能够影响鼻咽癌细胞的细胞周期分布和凋亡水平。此后,又有多个 lncRNA 被发现在鼻咽癌中差异表达且具有重要的生物功能<sup>[14-17]</sup>。然而,还有大量与头颈部鳞状细胞癌发生、发展和转归相关的 lncRNA 表达、功能及分子机制尚不清楚。

本研究通过对 GEPIA 数据库的 TCGA 进行数据挖掘,发现 HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌中高表达,且其与患者的预后密切相关;继而利用 qRT-PCR 技术在 24 例头颈部鳞状细胞癌中验证了 HOXA11-AS 的高表达;最后在利用 RNAi 技术干扰了 HOXA11-AS 的表达后,检测了其对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移能力的影响。本研究首次证实了 HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌中高表达,沉默 HOXA11-AS 表达能够在体外抑制人头颈部鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 的迁移能力。这极大地丰富了 lncRNA 参与头颈部鳞状细胞癌发生、发展过程的机制。但是,HOXA11-AS 影响头颈部鳞状细胞癌细胞迁移的具体分子机制以及其在头颈部鳞状细胞癌中是否还具有其他的生物功能,目前尚不十分清楚,还有待深入研究。

综上所述,HOXA11-AS 在头颈部鳞状细胞癌中发挥着类似致癌基因的功能,能够显著促进头颈部鳞状细胞癌细胞的迁移。深入理解其作用机制,将对未来头颈部鳞状细胞癌的生物标志物开发和治疗靶点确证具有较大的意义。

参考文献:

[1] GONG Z,ZHANG S,ZHANG W,et al. Long non-coding RNAs in cancer[J]. *Sci China Life Sci*,2012,55(12):1120-1124.  
[2] LAU E. Non-coding RNA: zooming in on lncRNA functions[J]. *Nat Rev Genet*,2014,15(9):574-575.  
[3] QUAGLIATA L,MATTER M S,PISCUOGLIO S,et al. Long non-coding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with dis-

ease pro-gression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Hepatology*,2014,59(3):911-923.  
[4] YANG X,SONG J H,CHENG Y,et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells[J]. *Gut*,2014,63(6):881-890.  
[5] LU M H,TANG B,ZENG S,et al. Long non-coding RNA BC032469,a novel compet-ing endogenous RNA, upregulates hTERT expression by sponging miR-1207-5p and promotes proliferation in gastric cancer[J]. *Oncogene*,2016,35(27):3524-3534.  
[6] ZHANG Y,HE R Q,DANG Y W,et al. Comprehensive analysis of the long noncoding RNA HOXA11-AS gene interaction regulatory network in NSCLC cells[J]. *Cancer Cell Int*,2016,16:89.  
[7] LIU Z,CHEN Z,FAN R,et al. Over-expressed long noncoding RNA HOXA11-AS promotes cell cycle progression and metastasis in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*,2017,16(1):82.  
[8] LI T,XU C,CAI B,et al. Expression and clinicopathological significance of the lncRNA HOXA11-AS in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*,2016,12(5):4155-4160.  
[9] KIM H J,EOH K J,KIM L K,et al. The long noncoding RNA HOXA11 antisense induces tumor progression and stemness maintenance in cervical cancer[J]. *Oncotarget*,2016,7(50):83001-83016.  
[10] TANG Z,LI C,KANG B,et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*,2017,45(W1):W98-W102.  
[11] LATOS P A,PAULER F M,KOERNER M V,et al. Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing[J]. *Science*,2012,338(6113):1469-1472.  
[12] GUPTA R A,SHAH N,WANG K C,et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*,2010,464(7291):1071-1076.  
[13] 谭琛,彭聪,黄宇琛,等. 鼻咽癌相关基因 NAG7 对鼻咽癌细胞周期及凋亡的影响[J]. *癌症*,2002,21(5):449-455.  
[14] GONG Z,ZHANG S,ZENG Z,et al. LOC401317, a p53-regulated long non-coding RNA, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the nasopharyngeal carcinoma cell line HNE2[J]. *PLoS One*,2014(11):e110674  
[15] BO H,GONG Z,ZHANG W,et al. Upregulated long non-coding RNA AFAP1-AS1 expression is associated with progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*,2015,6(24):20404-20418.  
[16] WANG Q,ZHANG W,HAO S. LncRNA CCAT1 modulates the sensitivity of paclitaxel in nasopharynx cancers cells via miR-181a/CPEB2 axis[J]. *Cell Cycle*,2017,16(8):795-801.  
[17] CHAK W P,LUNG R W,TONG J H,et al. Downregulation of long non-coding RNA MEG3 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*,2017,56(3):1041-1054

( 本文编辑:孟月 英文编辑:孟月 )