

长链非编码 RNA HOTAIR 对非小细胞肺癌 迁移和侵袭能力的影响*

210029 南京 南京医科大学第一临床医学院临床医学系

林梦洁, 陈志强, 尹凌帝, 孙倩, 刘博巽, 孙明¹, 德伟¹, 刘志军^{1,2}

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA HOTAIR 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织及 4 株细胞系(A549、SPC-A1、SK-MES-1 和 16HBE)中的表达,并分析其对细胞侵袭和迁移能力的影响。方法 通过定量反转录 PCR(qRT-PCR)检测 HOTAIR 在 38 例 NSCLC 组织及 4 株细胞系中的表达水平,并进一步利用过表达和 RNA 干扰技术探讨 HOTAIR 的生物学功能。通过分别转染 pcDNA-HOTAIR 或 si-HOTAIR 来上调或下调 HOTAIR 的表达,以空载体(pcDNA3.1-NC)和阴性对照(si-NC)作为对照组,用 qRT-PCR 检测转染效率。用 MTT 法和 Transwell 法评估异常表达的 HOTAIR 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果 38 例 NSCLC 组织中 HOTAIR 相对表达水平为 24.48 ± 59.55 。与正常支气管上皮细胞系 16HBE 相比,HOTAIR 在 SPC-A1 和 SK-MES-1 细胞中相对高表达,而在 A549 细胞中相对低表达。转染 HOTAIR siRNA 48h 后,A549 和 SPC-A1 细胞中 HOTAIR 表达下调;转染 pcDNA3.1-HOTAIR 48h 后,A549 细胞中 HOTAIR 表达上调。MTT 实验显示,通过 RNAi 技术来抑制 HOTAIR 的表达,对 NSCLC 细胞的增殖能力无明显影响。Transwell 实验显示,通过转染 si-HOTAIR 来下调 HOTAIR 表达可抑制癌细胞的迁移和侵袭($P < 0.05$);相反,过表达 HOTAIR 可以显著促进癌细胞的迁移和侵袭($P < 0.05$)。结论 HOTAIR 在 NSCLC 中异常高表达,能显著增强 NSCLC 细胞的迁移和侵袭能力,提示可能与不良预后相关。

【关键词】 非小细胞肺癌; 长链非编码 RNA; HOTAIR; 迁移; 侵袭

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)08-0684-06

Influence of down-regulated long noncoding RNA HOTAIR on migration and invasion of non-small cell lung cancer cell lines

LIN Mengjie, CHEN Zhiqiang, YIN Lingdi, SUN Qian, LIU Boxun, SUN Ming, DE Wei, LIU Zhijun. Department of Clinical Medicine, the First School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: LIU Zhijun, E-mail: liuzhijun100200@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression profile of long noncoding RNA HOTAIR in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and four different cell lines (A549, SPC-A1, SK-MES-1 and 16HBE), and to study its biological functions in NSCLC carcinogenesis and progression, especially on cell migration and invasion. **Methods** Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) was performed to detect the relative expression of HOTAIR in thirty-eight NSCLC tissues and four cell lines (A549, SPC-A1, SK-MES-1 and 16HBE). To further explore its biological function, techniques of overexpression and RNA interference (RNAi) were applied. pcDNA-HOTAIR or si-HOTAIR was transfected to up or down-regulate HOTAIR expression in NSCLC cells respectively, and the transfection efficiency was evaluated by qRT-PCR. MTT assay and Transwell assay were performed to evaluate the effect of ectopic HOTAIR expression on proliferation, migration and invasion potential of NSCLC cells. **Results** The relative expression of HOTAIR in 38 cases of NSCLC tissues was 24.48 ± 59.55 . Compared with normal bronchial epithelium cell 16HBE, there was a relatively high expression of HOTAIR in SPC-A1 and SK-MES-1 cells, and a relatively low expression in A549 cell. The HOTAIR expression was down-regulated in A549 and SPC-A1 cells at 48h after transfection of HOTAIR siRNA, and up-regulated in A549 cells at 48h after transfection of pcDNA3.1-HOTAIR. MTT assay indicated that RNAi-mediated suppression of HOTAIR had little effect on cell proliferation,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070620)

1 210029 南京医科大学生物化学与分子生物学系

2 通讯作者,E-mail:liuzhijun100200@126.com

while Transwell assay indicated that inhibition of HOTAIR by si-HOTAIR could repress cell migration and invasion ($P < 0.05$); conversely, overexpression of HOTAIR could significantly promote cell migration and invasion ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of HOTAIR is significantly up-regulated in NSCLC, which can promote cell migration and invasion. HOTAIR may be a new biomarker of poor prognosis in NSCLC.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer(NSCLC); Long noncoding RNA; HOTAIR; Migration; Invasion

2013 年美国癌症协会的调查数据显示,肺及支气管癌症在美国 40 岁以上男性及 60 岁以上女性癌症致死原因中居于首位^[1]。其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺恶性肿瘤的主要病理类型,也是全世界范围内癌症致死的主要原因之一。尽管最近在 NSCLC 的临床和实验肿瘤学方面的研究取得了较大进展,但是其预后仍不理想,5 年生存率仅提高到 11%左右^[2],将近一半的患者确诊时已进入晚期,并已发生远处脏器的转移^[3]。因此,早期诊断和治疗对改善 NSCLC 的预后至关重要。

近年来的研究显示,相当一部分(>90%)人类基因组可被转录为长度不一的非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA),并具有有限的甚至不具备蛋白编码功能^[4-5]。继 microRNA 之后,长链非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)的发现再次推动了 ncRNA 研究领域的进展。通过深入研究 lncRNA 参与的多个生物学过程,发现其能在多个层面调控基因表达^[6-8],其表达失调与包括癌症在内的多种疾病相关。lncRNA 可能通过染色质修饰复合体来影响表观遗传学状态,并传递多个肿瘤进展和转移所需要的表型^[9-11]。而且,lncRNA 可能是癌基因和抑癌基因调控网络中的关键结点。因此,识别癌症相关的尤其是特异的 lncRNA 并研究其与蛋白编码基因之间的相互作用是癌症生物学的重要课题,能够促进对癌症发生机制的理解。

其中,HOX 基因的反义基因间 RNA(Hox transcript antisense intergenic RNA, HOTAIR)是研究较少的 lncRNA 之一,其长度为 2158bp,以反式沉默的方式发挥作用^[12]。HOTAIR 在乳腺癌、结肠癌、肝癌和胰腺癌等多种肿瘤中的研究已取得一定进展,提示其可能在调控癌症进展中发挥直接作用,与疾病的预后相关^[13-16]。但其在 NSCLC 形成或转移中的作用机制仍知之甚少。本研究旨在探讨 HOTAIR 在 NSCLC 中的表达模式,通过体外实验研究异常表达的 HOTAIR 对 NSCLC 细胞的增殖、迁移及侵袭等恶性生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 收集江苏省人民医院 2006 年至 2008 年 38 例 NSCLC 患者手术切除的癌组织及其对应的癌旁正常组织标本。所有患者在手术前均未接受过局部或全身治疗。所有标本取下后立刻用液氮冷冻,并在使用前一直于 -80°C 冻存。本研究经南京医科大学伦理委员会批准通过,并获得所有患者的知情同意书。

NSCLC 腺癌细胞系(A549、SPC-A1)和鳞癌细胞系(SK-MES-1)及人类正常支气管上皮细胞系(16HBE)均购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。RPMI 1640 培养基、DMEM(GIBCO-BRL)培养基、10%胎牛血清、Trizol 试剂、质粒表达载体 pcDNA3.1、3 个独立的小干扰 RNA(siRNAs)以及阴性对照 siRNA(si-NC)、转染试剂 Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司;PrimeScript 反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq 均购自日本 Takara 公司;Midiprep 试剂盒购自德国 Qiagen 公司;MTT 试剂盒购自罗氏公司;Transwell 实验中的小室购自 Millipore 公司;Matrigel 和 0.1% 的结晶紫购自 Sigma-Aldrich 公司;IX71 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 上述细胞用 RPMI-1640 或 DMEM(GIBCO-BRL)培养基培养,补充 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素以及 100mg/ml 链霉素,置于 37°C 、含 5% CO_2 的饱和湿度恒温培养箱中常规培养。每 1~2 天更换新鲜培养基,当细胞融合度达到 80%~90%时进行传代培养。

1.2.2 质粒构建 为构建 HOTAIR 的表达载体,使用 PCR 从 SPC-A1 细胞的 cDNA 扩增一个全长的 HOTAIR 片段。用于扩增的 HOTAIR 的寡核苷酸序列为:上游:5'-CATGGATCCACATTCTGCCCTGATTTCCGGAACC-3',下游:5'-ACTCTCGAGCCACCACACACACAACCTACAC-3',分别包含外源性 Hind III 和 Xho I 位点。验证 PCR 的产物并亚克隆至哺乳动物表达载体 pcDNA 3.1 中。

1.2.3 细胞转染 转染 pcDNA3.1-HOTAIR 至 A549 细胞系中,以空的 pcDNA 载体 (pcDNA3.1-NC) 作为对照组,并应用定量反转录 PCR (qRT-PCR) 检测 HOTAIR 的表达水平。所有用于转染的质粒载体经 DNA Midiprep 试剂盒提取。3 个独立的 HOTAIR siRNA 的靶序列分别为: si-HOTAIR 1: 5'-AAUCCAGAACCCUCUGACAUUUGC-3'; si-HOTAIR 2: 5'-UUAAGUCUAGGAAUCAGCACGAAGC-3'; si-HOTAIR 3: 5'-CAUAUUAUAGAGUUGCUCUGUGCUG-3'。将 HOTAIR siRNAs (si-HOTAIR 1、si-HOTAIR 2、si-HOTAIR 3) 及阴性对照 si-NC (对照组) 转染至 SPC-A1 和 A549 细胞。将上述细胞培养于 6 孔培养板中,通过 Lipofectamine 2000 进行载体及对照组的转染,具体方法参见产品说明书。转染后 48h 收集各组细胞用于 qRT-PCR 分析。

1.2.4 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 应用 qRT-PCR 检测 38 例 NSCLC 组织及分别转染了 pcDNA3.1-HOTAIR 和 si-HOTAIR 及其对照组细胞中 HOTAIR 的表达水平。使用 Trizol 试剂提取组织或培养细胞的总 RNA。使用 PrimeScript 反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq 进行 qRT-PCR 分析,检测 HOTAIR 的表达水平,结果用磷酸甘油酸脱氢酶 (GAPDH) 的表达量进行标准化。HOTAIR 的 PCR 引物为:上游引物:5'-CAGTGGGAACTCTGACTC-G-3',下游引物:5'-GTGCCTGGTGCTCTCTTACC-3'; GAPDH 上游引物:5'-GGGAGCCAAAAGGGTC-AT-3',下游引物:5'-GAGTCCTTCCACGATACCA-A-3'。使用 ABI 7500 进行 qRT-PCR 和数据收集。分析 qRT-PCR 的结果并计算其相对于临界循环次数的值,然后转换为相对 GAPDH 的倍数改变,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行标准化。

1.2.5 细胞增殖实验 使用 MTT 法检测 NSCLC 细胞的生长情况。在 96 孔平板上分别加入转染 si-HOTAIR 的 SPC-A1 细胞和 A549 细胞 (每孔 3000 个) 和转染 pcDNA3.1-HOTAIR 的 A549 细胞 (每孔 2000 个),每 24h 记录细胞增殖的情况。用全自动酶标仪测定 490nm 波长处各孔的吸光值 (A),并计算不同时间点与 0h A 值的比值,以反映细胞生长的活性。实验独立重复 4 次。

1.2.6 细胞迁移和侵袭实验 上述细胞在转染后 48h 进行 Transwell 实验。迁移实验中,将 5×10^4 个细胞加入上层的无血清培养基中;侵袭实验中,将 1×10^5 个细胞加入上层的无血清培养基中;下层小室

为含有 10% 胎牛血清的培养基。孵育 24h 后,用甲醇固定迁移或侵袭至下层的细胞并用 0.1% 的结晶紫染色,并用 IX71 倒置显微镜计数。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析;计数资料组间比较用 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织及不同 NSCLC 细胞株中 HOTAIR 的表达 38 例 NSCLC 组织中 HOTAIR 的相对表达水平为 24.48 ± 59.55 。在 3 株 NSCLC 细胞系中,HOTAIR 的表达水平呈现出异质性。与正常支气管上皮细胞系 (16HBE) 相比,HOTAIR 在 SPC-A1 细胞中显著高表达,其表达水平为 16HBE 细胞的 3.23 倍 ($P < 0.01$);HOTAIR 在 SK-MES-1 细胞中的表达亦增加,为 16HBE 细胞的 1.34 倍 ($P < 0.05$);而在 A549 细胞中 HOTAIR 表达水平相对较低,为 16HBE 细胞的 54.21% ($P < 0.05$)。见图 1。

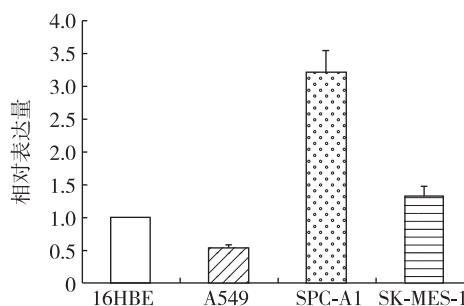


图 1 不同 NSCLC 细胞系中 HOTAIR 的相对表达水平

2.2 外源性调控 HOTAIR 在 NSCLC 细胞株中的表达 在 A549 和 SPC-A1 细胞中,干扰效果最强的 siRNA (si-HOTAIR 3) 将 HOTAIR 表达下调至对照组 (si-NC) 的 25% 和 21% ($P < 0.01$)。因此,选择使用 si-HOTAIR 3 进行后续的实验。在转染了 pcDNA3.1-HOTAIR 的 A549 细胞中,HOTAIR 的表达增加至对照组的 28 倍 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 HOTAIR 表达对细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示,通过转染 si-HOTAIR 降低 NSCLC 细胞中 HOTAIR 表达水平,并未显著影响 NSCLC 细胞的生长。见图 3。

2.4 HOTAIR 对细胞迁移和侵袭的影响 Transwell

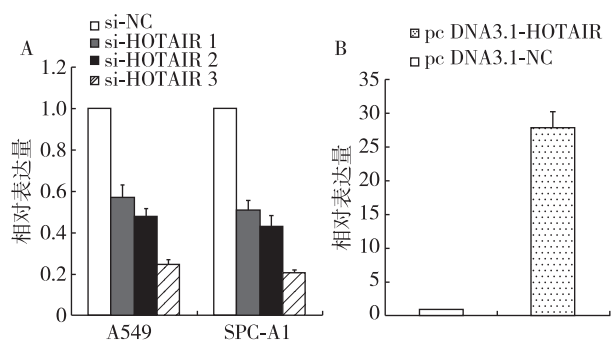


图 2 外源性调控 HOTAIR 在 NSCLC 细胞中的表达
A: 转染 si-HOTAIR; B: 转染 pcDNA-HOTAIR

实验结果显示,通过转染 si-HOTAIR 来下调 HOTAIR 表达可以抑制癌细胞的迁移和侵袭能力($P < 0.05$)。

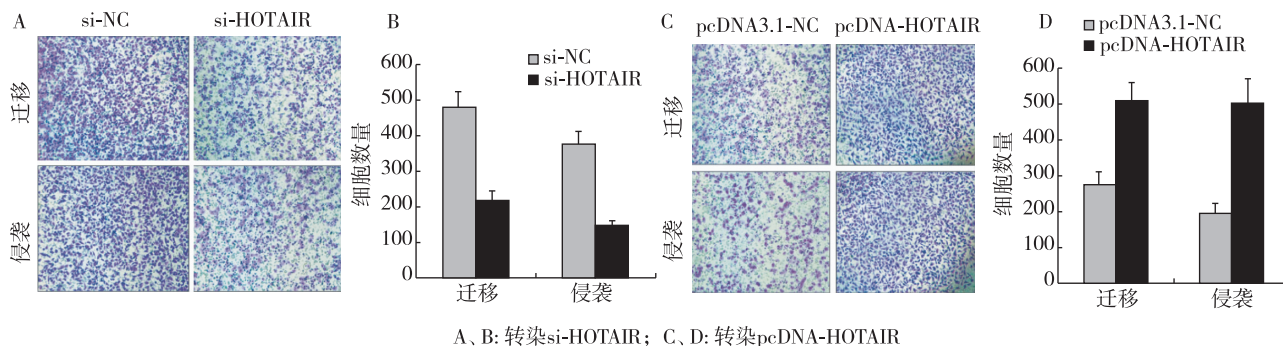


图 4 抑制或过表达 HOTAIR 对 NSCLC 细胞迁移和侵袭能力的影响
A、B: 转染 si-HOTAIR; C、D: 转染 pcDNA-HOTAIR

3 讨论

NSCLC 是最常见的致死性恶性疾病之一,其发生是多因素共同导致的结果,其中涉及遗传学和表观遗传学的改变,包括癌基因和原癌基因的突变、DNA 甲基化状态的改变以及 ncRNA 表达的失调等。NSCLC 早期诊断效果较差主要与其转移特性有关^[17],但诱导和刺激 NSCLC 转移的过程较复杂,具体机制尚不清楚。

近年来,ncRNA 在肿瘤发生发展中的调控作用逐渐引起人们的关注。在人类基因组中,ncRNA 广泛存在于细胞核和胞质内,包括 miRNA、piRNA 以及 lncRNA 等^[4]。迄今为止,大量 miRNA 在 RNAi 通路、肿瘤抑制和形成中的作用已经得到证实^[18]。而对于 lncRNA 的相关研究则较少,越来越多的研究者开始把目光投向这一领域。多个 lncRNA 已被发现与肺癌具有密切关系。H19 作为首个被发现与癌症相关

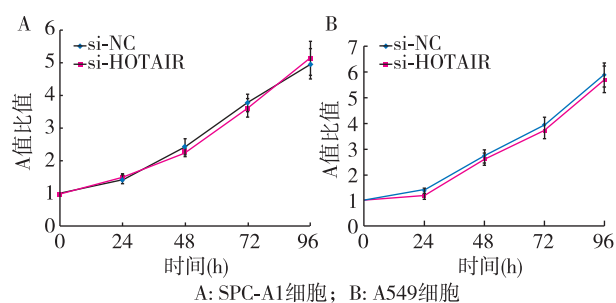


图 3 靶向敲除 HOTAIR 对 NSCLC 细胞增殖能力的影响
A: SPC-A1 细胞; B: A549 细胞

相反,通过转染 pcDNA-HOTAIR 来过表达 HOTAIR 可以增强癌细胞的迁移和侵袭能力($P < 0.05$)。见图 4。

的 lncRNA,能够促进肺癌细胞生长^[19]。Schmidt 等^[20]证实 MALAT1 可以作为预测 NSCLC 转移和生存的标志物。此外,与 NSCLC 发生发展相关的 lncRNA 还包括 LET^[21]、lincRNA p21^[22]、UCA1^[23] 以及 BC200^[24]等。然而,lncRNA 在 NSCLC 中的具体作用机制目前仍知之甚少,且缺乏特异性。

本研究通过定量检测 HOTAIR 在 NSCLC 组织及细胞中的表达水平,并通过体外实验初步探讨其异常表达对于影响 NSCLC 发生和进展可能的分子生物学机制。有研究报道 HOTAIR 在乳腺癌、肝癌和胰腺癌等多种肿瘤中高表达,通过组蛋白甲基化抑制多种抑癌基因的表达从而参与肿瘤进展,能作为新的肿瘤预后因子^[13,15-16,25-28]。在胃癌中,HOTAIR 异常高表达,与肝转移和腹膜播散等不良预后有关^[29-30]。HOTAIR 的高表达与表观遗传学机制有关,通过招募多聚梳抑制复合体(polycomb repressive complex 2, PRC2),使组蛋白 H3 的 K9 和

K27 位点发生三甲基化,从而调控靶基因的表达参与胃癌进展。在食管鳞状细胞癌中,HOTAIR 通过激活启动子区域组蛋白 H3K27 甲基化,直接抑制 WIF-1 表达,继而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。在结肠癌及乳腺癌中,HOTAIR 通过调控多种信号机制,参与上皮间质转化过程,维持肿瘤干细胞的干性^[31]。这些机制对 HOTAIR 在 NSCLC 发生发展中的作用具有一定的参考意义。目前对于 HOTAIR 在 NSCLC 中的作用仍知之甚少,需要更多的实验研究加以阐明。HOTAIR 可能与 NSCLC 平均无瘤生存期相关,其表达程度与肿瘤细胞的侵袭性具有正相关性^[32]。Zhuang 等^[33]的研究证实 HOTAIR 能够被 I 型胶原诱导产生,从而促进 NSCLC 发生。

本研究证实 NSCLC 组织中普遍呈现出 HOTAIR 高表达的特点;其在 3 株不同 NSCLC 细胞系中的表达具有特异性,在 SPC-A1 和 SK-MES-1 细胞中相对高表达,而在 A549 细胞中相对低表达。为探讨 HOTAIR 异常表达在 NSCLC 发生发展中可能的生物学作用,本研究采用细胞转染的方法对其增殖、迁移和侵袭能力进行分析。通过转染 pcDNA-HOTAIR 或 si-HOTAIR 能够有效调节其在细胞中的表达水平,实现其在外源性调控下的异常表达。一方面,癌细胞的一个显著特点是不受机体控制的异常增殖能力。MTT 实验显示通过靶向敲除 HOTAIR 来抑制 HOTAIR 的表达并不能显著影响 NSCLC 细胞的生长活性和增殖能力。另一方面,癌细胞的迁移和侵袭能力是其恶性生物学行为的表现,也是影响疾病进展和预后的重要因素。Transwell 实验显示下调 HOTAIR 表达可以显著减少细胞迁移和侵袭,提示 HOTAIR 高表达与癌细胞恶性生物学行为之间的相关性。

综上所述,上调 HOTAIR 表达促进了癌细胞的迁移和侵袭,提示可能与 NSCLC 的不良预后有关,并预示有较高的转移风险。HOTAIR 将可能成为 NSCLC 新的生物学标志物和药物靶点。本研究提示 HOTAIR 在 NSCLC 的发生发展中可能起到重要作用,但其具体机制仍需进一步研究,为将来的临床诊断及治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. CA: a cancer journal for clinicians[J].Cancer statistics, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO-CARE-4 data[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(9): 784-796.
- [3] Coleman M P, Forman D, Bryant H, et al. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007(the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data[J]. The Lancet, 2011, 377(9760): 127-138.
- [4] Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project[J]. Nature,2007,447(7146):799-816.
- [5] Bertone P, Stolc V, Royce TE, et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays [J]. Science, 2004, 306(5705):2242-2246.
- [6] Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic non-coding RNA transcription: expression noise or expression choice [J].Genomics,2009, 93(4):291-298.
- [7] Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs[J].Cell,2011,145(2):178-181.
- [8] Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease[J].Trends Cell Biol,2011,21(6):354-361.
- [9] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 (INK4B) tumor suppressor gene [J].Oncogene, 2011, 30(16):1956-1962.
- [10] Wu HA, Bernstein E. Partners in imprinting: noncoding RNA and polycomb group proteins [J]. Dev Cell, 2008, 15(5):637-638.
- [11] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. PNAS, 2009, 106(28):11667-11672.
- [12] Saxena A, Carninci P. Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs [J]. Bioessays, 2011, 33(11):830-839.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits prooncogenic activity in pancreatic cancer [J].Oncogene,2013,32(13):1616-1625.
- [17] Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G. H. A. Clowes memorial award lecture [J]. Cancer Res, 1990, 50(19):6130-6138.

- [18] Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer[J]. *Clin Chem*, 2009, 55:623-631.
- [19] Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10):5330-5337.
- [20] Schmidt LH, Spieker T, Koschmieder S, et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(12):1984-1992.
- [21] Yang F, Huo X, Yuan S, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1083-1096.
- [22] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response[J]. *Cell*, 2010, 142(3):409-419.
- [23] Wang F, Li X, Xie X, et al. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(13): 1919-1927.
- [24] Chen W, Böcker W, Brosius J, et al. Expression of neural BC200 RNA in human tumours[J]. *J Pathol*, 1997, 183(3): 345-351.
- [25] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by non-coding RNAs[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1311-1323.
- [26] Yang Z, Lai MC, Xie HY. 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.
- [27] Li D, Feng J, Wu T, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(1): 64-70.
- [28] Nie Y, Liu X, Qu S, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(4): 458-464.
- [29] Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, et al. Up-regulation of HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(3): 670.
- [30] Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, et al. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2013[2014-02-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130837>.
- [31] Alves CP, Fonseca AS, Muys BR, et al. The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cells lines [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(12):2827-2832.
- [32] 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.
- [33] Zhuang Y, Wang X, Nguyen HT, et al. Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen[J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6(1): 35.

收稿日期:2014-04-14; 修回日期:2014-05-17