

shHOTAIR 对上皮性卵巢癌细胞侵袭及裸鼠致瘤能力的影响*

周育夫¹, 陈登宇^{2△}, 褚一凡³, 郑庆委², 徐志本²

1. 蚌埠医学院第一附属医院 放射治疗科 (蚌埠 233003); 2. 蚌埠医学院 病原生物学教研室
安徽省感染与免疫重点实验室 (蚌埠 233030); 3. 蚌埠医学院 显微形态实验中心 (蚌埠 233030)

【摘要】 目的 探讨短发夹 RNA(shRNA)降低人上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞中长链非编码 RNA(lncRNA) HOTAIR 基因表达后对 SKOV3 细胞的侵袭、裸鼠致瘤能力及锌指转录因子 snail 基因表达的影响。**方法** RT-PCR 检测 SKOV3 细胞 lncRNA HOTAIR 的表达;构建靶向人 lncRNA HOTAIR 基因表达的干扰质粒 shHOTAIR,经脂质体转染 SKOV3 细胞后筛选稳定转染细胞株,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 lncRNA HOTAIR 在 SKOV3 转染细胞中的表达。利用 Transwell 小室基质胶侵袭试验及裸鼠致瘤实验,检测不同转染 SKOV3 细胞侵袭及裸鼠致瘤能力,获取荷瘤鼠肿瘤组织块,进行免疫组化染色及 Western blot 检测荷瘤鼠肿瘤组织中 snail 蛋白的表达,qRT-PCR 检测 E-cadherin、snail mRNA 的表达。**结果** RT-PCR 检测结果显示 SKOV3 细胞表达 lncRNA HOTAIR;成功构建干扰质粒 shHOTAIR,稳定转染 SKOV3 细胞(shHOTAIR-SKOV3)后,与对照组 scramble-SKOV3 细胞比较,lncRNA HOTAIR 表达下降($P<0.01$);shHOTAIR-SKOV3 细胞与对照组 scramble-SKOV3 细胞相比,对 transwell 小室基质胶侵袭能力、裸鼠致瘤能力下降、荷瘤鼠肿瘤体积下降($P<0.01$),荷瘤鼠肿瘤组织免疫组化染色及 Western blot 检测结果显示,snail 蛋白表达降低($P<0.05$),qRT-PCR 检测显示,荷瘤鼠肿瘤组织 snail 表达降低($P<0.05$),E-cadherin 表达增高($P<0.05$)。**结论** lncRNA HOTAIR 表达下调可引起上皮性卵巢癌细胞 snail 表达降低、E-cadherin 表达增高,并使卵巢癌细胞侵袭及裸鼠致瘤能力降低,提示 lncRNA HOTAIR 作为治疗靶点,可能具有靶向治疗上皮性卵巢癌细胞的潜在应用价值。

【关键词】 上皮性卵巢癌 lncRNA HOTAIR RNA 干扰 致瘤性 snail

Effects of Targeting lncRNA HOTAIR on the Invasion and Nude Mouse Tumorigenicity of Epithelial Ovarian Cancer Cells ZHOU Yu-fu¹, CHEN Deng-yu^{2△}, CHU Yi-fan³, ZHENG Qing-wei², XU Zhi-ben². 1. Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China; 2. Department of Pathogenic Biology, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 3. Laboratory Center for Morphology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China
△ Corresponding author, E-mail: chengong131@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of shRNA-mediated downregulating lncRNA HOTAIR on the invasion, nude mouse tumorigenicity and snail expression of epithelial ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods** The expression of lncRNA HOTAIR was detected by RT-PCR in SKOV3 cells. The shRNA targeting the lncRNA HOTAIR gene was cloned into RNA interference plasmid. The construction shHOTAIR vector was transfected into ovarian cancer SKOV3 cells by lipofectamine 2000, and the stably transfected cells were isolated by G418 and single clone selection. The downregulating expression of lncRNA HOTAIR was detected by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The characteristics of shHOTAIR transfected SKOV3 cells were analyzed from the assays of invasion and nude mouse tumorigenicity, as well as the expression of snail and E-cadherin mRNA detected by qRT-PCR, and snail detected by immunohistochemistry and Western blot methods in xenograft tumor, respectively. **Results** The lncRNA HOTAIR expression was proved by RT-PCR in SKOV3 cells. The lncRNA HOTAIR expression in shHOTAIR transfected SKOV3 cells was significantly lower than the scramble control ($P<0.01$). The shHOTAIR transfected SKOV3 cells show that the invasion ability was significantly decreased compared with the scramble control ($P<0.01$). The nude mouse tumorigenicity, including tumorigenicity mouse number and tumor

* 安徽省高等学校自然科学研究项目(No. KJ2015B016by)、安徽高校自然科学研究重点项目(No. KJ2016A461)和安徽高校科研新平台团队项目(No. 2016-40)资助

△ 通信作者, E-mail: chengong131@sina.com

volume, was significantly decreased compared with the control group ($P<0.01$). The snail protein expression detected by IHC and Western blot in *shHOTAIR*-SKOV3 xenograft tumor was significantly decreased compared with the control scramble- SKOV3 group ($P<0.05$). The lncRNA *HOTAIR* low expression resulted in increasing E-cadherin and decreasing snail expression detected by qRT-PCR in the *shHOTAIR* transfected SKOV3 cells of xenograft tumor, compared with the scramble control ($P<0.05$). **Conclusion** Targeting lncRNA *HOTAIR* expression in SKOV3 cells with RNA interference can decrease snail, increase E-cadherin and significantly reduce the invasion and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer SKOV3 cells. These results suggest that the lncRNA *HOTAIR* could be an effective therapeutic target for human epithelial ovarian cancer treatment.

【Key words】 Epithelial ovarian cancer lncRNA *HOTAIR* RNA interference Tumorigenicity snail

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer,EOC)是卵巢癌中常见的病理类型,EOC亦是常见的妇科恶性肿瘤^[1]。卵巢癌所在解剖位置隐匿,症状出现、发现时多已发展为中晚期,多数 EOC 已直接蔓延至腹腔发生转移。外科手术治疗后亦因肿瘤的侵袭和转移,导致患者 5 年生存率低,因而 EOC 成为女性恶性肿瘤中病死率较高的类型^[2]。

近年发现,长链非编码 RNA (large intergenic non-coding RNA, lncRNA) 调节细胞染色体基因 DNA 的转录表达^[3],在肿瘤的生长增殖及侵袭转移中发挥的作用有待深入研究,以利于控制疾病,选择有效的分子调控靶点。lncRNA 中同源基因 (HOX) 转录反义 RNA (HOX antisense intergenic RNA, HOTAIR) 参与多种肿瘤细胞生长、侵袭转移及上皮间质转化进程,成为靶向治疗恶性肿瘤有价值的潜在靶点^[4]。但 lncRNA *HOTAIR* 调控肿瘤生长和迁移侵袭的上下游调节蛋白分子还未阐明,靶点的预测、验证成为 lncRNA *HOTAIR* 研究的难点和重点。为此,本研究首先构建靶向 lncRNA *HOTAIR* 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 重组干扰质粒 *shHOTAIR*, 转染人 EOC 细胞株 SKOV3 细胞后检测其对 lncRNA *HOTAIR* 表达的影响,进行功能性实验了解 lncRNA *HOTAIR* 下调对肿瘤细胞侵袭能力及裸鼠体内致瘤能力的影响,并探讨其可能的分子作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

人 EOC 细胞株 SKOV3 购自上海中科院细胞所;3~4 周龄、15~20 g 的 Balb/c 雌性裸鼠购于扬州大学动物实验中心;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒购自罗氏公司;质粒提取试剂盒、限制性核酸内切酶及连接酶等购自美国 Promega 公司;RNA 提取试剂、脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司;

G418 购自 Sigma 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;基质胶购自 BD 公司。逆转录 (RT)-PCR 试剂盒、锌指转录因子 snail 抗体及免疫组化检测试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 干扰质粒构建及转染

参考文献^[5] 方法操作,构建干扰质粒 *shHOTAIR* 及阴性对照干扰质粒 scramble (scramble 为杂带对照),并经测序证实构建成功^[5]。以脂质体 2000 将构建的干扰质粒分别转染入卵巢癌 SKOV3 细胞,然后以构建载体干扰质粒表达绿色荧光蛋白 (GFP) 及 G418 抗性为特征,筛选稳定转染细胞株。以含 1 000 $\mu\text{g/mL}$ G418, 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基初步筛选转染成功的 G418 抗性 SKOV3 细胞。荧光显微镜下可见表达 GFP 的阳性转染细胞,再以有限稀释法筛选得到阳性单个细胞克隆,挑选 3 个阳性单克隆细胞组成混合细胞系,扩大培养,获得稳定转染细胞株 (*shHOTAIR*-SKOV3 和 scramble- SKOV3),用于后续功能性实验检测。

1.3 RT-PCR、qRT-PCR 检测细胞和组织中 lncRNA *HOTAIR*、snail 及 E-cadherin 基因的表达

抽提转染前 SKOV3 细胞、稳定转染后的 *shHOTAIR*-SKOV3 及 scramble- SKOV3 细胞和转染后荷瘤鼠肿瘤块组织总 RNA,随机引物逆转录 RNA,扩增 lncRNA *HOTAIR*、人 snail 及钙粘蛋白-E (E-cadherin) 基因,以 β -actin 作为内参。lncRNA *HOTAIR* 引物,上游 5'-GGTAGAAAAA GCAACCACGAAGC-3',下游 5'-TTGGGGAAG CATTTTCTGAC-3',扩增产物 744 bp; lncRNA *HOTAIR* 采用 RT-PCR 和使用 ABI 荧光定量 PCR 仪,进行 qRT-PCR 检测。E-cadherin 引物,上游 5'-TACACTGCCCAGGAGCCAGA -3',下游 5'-TGGCACCAGTGTCCGGATTA-3',扩增产物 103 bp; 人 snail 引物,上游 5'-CTAGGCCCTGG

CTGCTACAAG-3', 下游 5'-AGCGGGACATCCT GAGCA-3', 扩增产物 225 bp; 内参 β -actin 引物, 上游 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', 下游 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3', 产物 234 bp。E-cadherin 和 snail 采用 qRT-PCR 检测。各引物由上海英骏生物技术有限公司合成。各基因反应条件按试剂盒说明书操作, 计算 ΔC_t , 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。并以对照组的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值作为 100%。

1.4 转染癌细胞 Transwell 小室基质胶侵袭试验

放 Transwell 小室于 24 孔板内, 将稀释好的基质胶置于 Transwell 上层, 凝固后每孔种植 2×10^4 个稳定转染 *shHOTAIR* 和 scramble 的 SKOV3 细胞, 小室下层加含血清完全培养基, 孵育 24 h 后取出小室, 清洗、固定、结晶紫染色, 晾干后在 100 倍视野下计数观察肿瘤细胞侵袭基质胶情况, 拍照记录、判断肿瘤细胞侵袭力。

1.5 转染癌细胞裸鼠致瘤实验

裸鼠饲养一周后, 分组在其背部皮下注射等量 *shHOTAIR*-SKOV3 和 scramble-SKOV3 细胞悬液 0.5 mL/只(含细胞 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), 每组 6 只裸鼠, 逐日监测各组小鼠肿瘤生长情况, 60 d 后, 剥离裸鼠背部肿瘤块。

1.6 荷瘤鼠肿瘤组织病理、snail 蛋白和 E-cadherin、snail mRNA 的表达

剥离的荷瘤鼠肿瘤块一部分进行石蜡包埋、病理切片, HE 染色及免疫组化染色, 封片, 光镜下观察其组织病理形态和 snail 蛋白表达; 一部分抽提蛋白及总 RNA, 采用常规 Western blot 检测 snail 蛋白的表达, 按 1.3 中 qRT-PCR 检测 E-cadherin、snail mRNA 的表达。免疫组化染色结果判定标准, 参考文献^[6], 采用 Sinicrope 改良法定量阳性结果判断, snail 蛋白染色以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性反应。根据阳性细胞所占比例(<5% 记 0 分, 5%~25% 记为 1 分, 26%~50% 记为 2 分, 51%~75% 记为 3 分, >75% 记为 4 分)和染色强度(不显色记为 0 分, 1 分为细胞核呈浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为深棕色)给予综合评分(每张切片分值=染色细胞数分值×染色强度分值。评分值<1 分, 则判断免疫组化结果呈阴性(-); 评分 1~3 分, 则为弱阳性(+); 评分 4~5 分, 则为阳性(++); 评分>5 分, 则为强阳性(+++)。

Western blot 检测结果用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值。以目的蛋白/GAPDH 灰

度的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

实验重复 3 次, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测卵巢癌 SKOV3 细胞 lncRNA HOTAIR 表达

由图 1 可见 lncRNA *HOTAIR* 扩增产物长度 744 bp, 证明上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞表达 lncRNA *HOTAIR*。

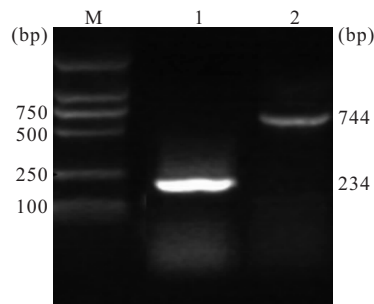


图 1 RT-PCR 检测卵巢癌 SKOV3 细胞 lncRNA *HOTAIR* 表达

Fig 1 lncRNA *HOTAIR* expression detected by RT-PCR in ovarian cancer SKOV3 cells

M: DNA maker; 1: β -actin 234 bp; 2: lncRNA *HOTAIR* 744 bp

2.2 重组质粒鉴定及转染、稳定转染细胞克隆筛选

以构建载体干扰质粒表达绿色荧光蛋白 GFP 及 G418 抗性为特征, 筛选的稳定转染细胞株见图 2。

2.3 qRT-PCR 检测 *shHOTAIR* 转染细胞 lncRNA HOTAIR 的相对表达

结果显示, *shHOTAIR* 稳定转染的卵巢癌细胞 lncRNA *HOTAIR* 相对表达率 ($47\% \pm 8\%$) 较 scramble 转染细胞 lncRNA *HOTAIR* 相对表达率 ($100\% \pm 9\%$) 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。该结果证明 *shHOTAIR* 干扰有效, 获得的 lncRNA *HOTAIR* 下调卵巢癌细胞株可用于 lncRNA *HOTAIR* 下调后相关功能性实验。

2.4 转染细胞侵袭力检测

由图 3 可见, *shHOTAIR* 组 SKOV3 细胞在每个视野下侵袭数量 (24 ± 5) 较对照 scramble 组每个视野下侵袭数量 (66 ± 7) 减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 转染细胞致瘤能力比较

观察裸鼠背部肿块出现时间发现, 接种 scramble-SKOV3 转染细胞的 6 只裸鼠在 14~23 d 陆续出现肿瘤块, 体积逐渐增大; 而接种 *shHOTAIR*-SKOV3 转染细胞的 3 只裸鼠至接种后 60 d 仍无肿瘤块出现, 而另外 3 只裸鼠在 17、23、25 d 观察到有肿瘤块出现, 肿瘤块出现时间较阴性对照组明显延迟, 而且致瘤肿块生长慢、体积亦较对照组小, 两组肿块体积差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 4。说明 *shHOTAIR*-SKOV3 组卵巢癌细胞致瘤能力下降。

2.6 肿瘤块病理学观察及 snail 蛋白的表达

荷瘤鼠肿瘤块切片 HE 染色(图 5)显示: 接种 scramble-SKOV3 转染细胞的肿瘤组织有明显核异质癌细胞, 增生活跃, 细胞核呈紫蓝色, 细胞浆呈红色, 细胞核浆比例增大, 细胞核呈卵圆或不规则形,

见有核仁; 而接种 *shHOTAIR*-SKOV3 转染细胞的肿瘤组织镜下见癌细胞增生欠活跃。

免疫组化染色结果和 Western blot 检测结果均显示, 接种 *shHOTAIR*-SKOV3 转染细胞的荷瘤鼠肿瘤组织 snail 的蛋白表达(免疫组化染色: 综合评分 3 ± 1 , Western blot 显示 snail 蛋白相对表达量 0.30 ± 0.06) 低于接种 scramble-SKOV3 转染细胞的荷瘤鼠肿瘤组织(免疫组化染色综合评分 5 ± 1 , Western blot 显示 snail 蛋白相对表达量 0.60 ± 0.07), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6, 图 7。说明下调 lncRNA *HOTAIR* 可引起 snail 蛋白表达降低。

2.7 肿瘤块 E-cadherin、snail mRNA 的表达

qRT-PCR 检测结果显示: 接种 *shHOTAIR*-SKOV3 转染细胞的荷瘤鼠肿瘤组织 E-cadherin 的

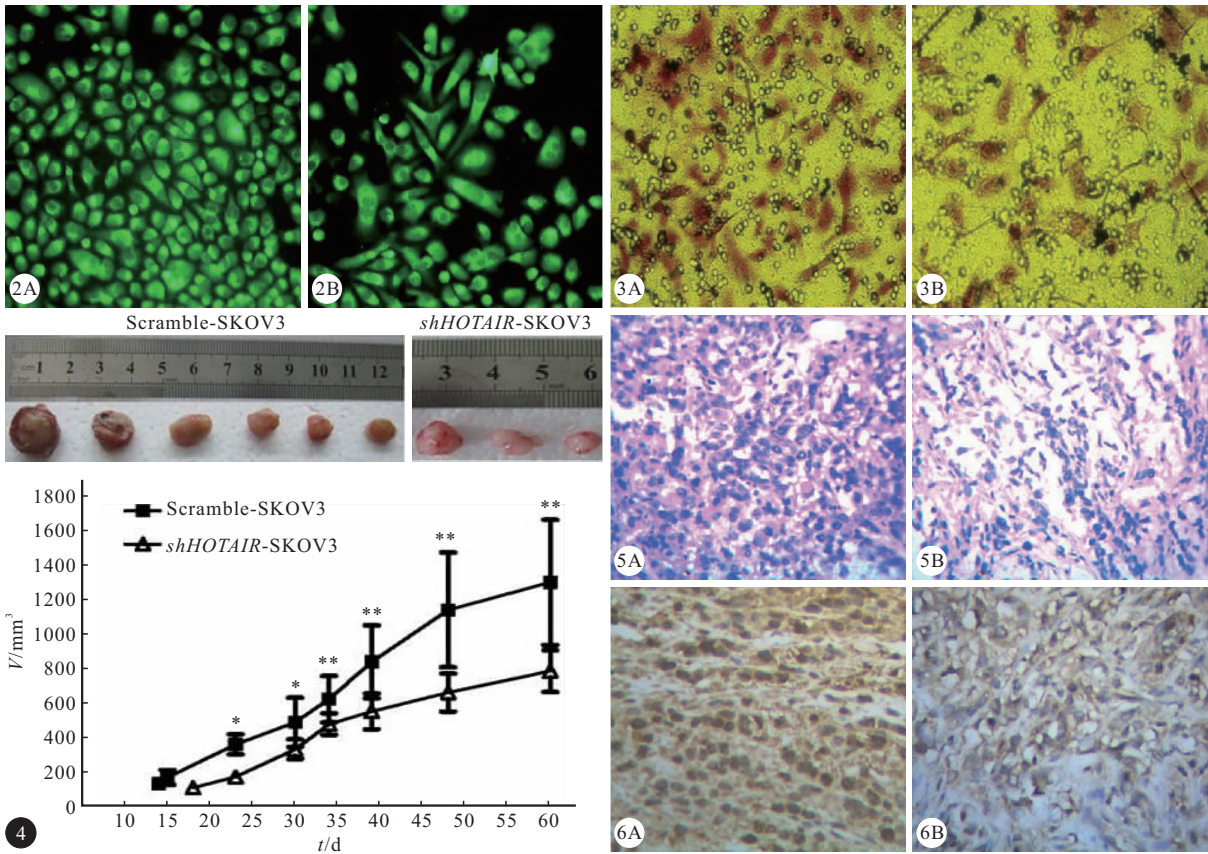


图 2 荧光显微镜检测转染筛选后卵巢癌 SKOV3 细胞 GFP 的表达。×400 图 3 Transwell 小室基质胶侵袭试验。×100 图 4 不同转染 SKOV3 细胞裸鼠致瘤实验肿块体积变化情况 图 5 肿瘤块 HE 染色。HE ×400 图 6 免疫组化检测肿瘤块中 snail 蛋白的表达情况。SP ×400

Fig 2 GFP expression detected by fluorescence microscope in transfected ovarian cancer SKOV3 cells. ×400 Fig 3 Transwell invasion assay. ×100 Fig 4 Tumor growth change in xenograft mice injected with various SKOV3 cells Fig 5 Tumor HE stain in xenograft mice injected with various SKOV3 cells. HE ×400 Fig 6 snail protein expression detected by IHC in xenograft tumor. SP ×400

A: Scramble-SKOV3; B: shHOTAIR-SKOV3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. shHOTAIR-SKOV3

mRNA 表达高于、snail mRNA 的表达低于接种 scramble-SKOV3 转染细胞的荷瘤鼠肿瘤组织,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 8。

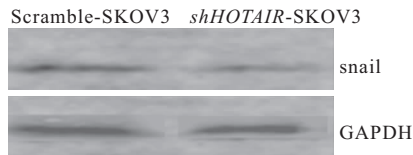


图 7 Western blot 检测肿瘤块 SKOV3 细胞中 snail 蛋白的表达

Fig 7 snail protein expression detected by Western blot in xenograft tumor

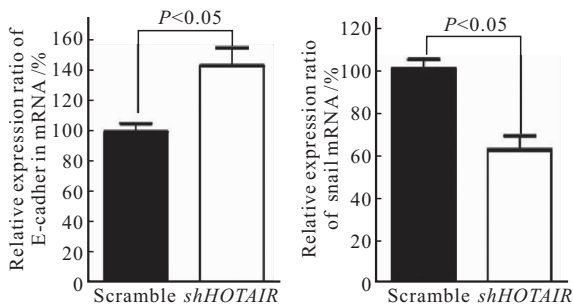


图 8 qRT-PCR 检测 E-cadherin 和 snail mRNA 的表达

Fig 8 E-cadherin and snail mRNA detected by qRT-PCR

3 讨论

EOC 是中年女性常见的恶性肿瘤,因发现晚、易转移、易复发,导致卵巢癌病死率占各类妇科肿瘤的首位^[1]。因此,探明 EOC 发生发展的胞内关键分子、蛋白等,针对此类靶点进行有针对性的分子靶向治疗,抑制肿瘤的生长和转移、清除肿瘤干细胞,才可能从根本上控制卵巢癌的发展、挽救患者的生命。近年研究发现,lncRNA HOTAIR 参与多种癌细胞生长转移和上皮间质转化上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程,成为靶向治疗恶性肿瘤有价值的潜在靶点^[3,4,7-9]。

研究发现,lncRNA HOTAIR 在上皮性卵巢癌中呈高表达,则提示患者预后差、癌肿多转移^[1],但其机制还有待研究。本研究体内外实验结果发现,降低 lncRNA HOTAIR 表达,可导致 EOCSKOV3 细胞中上皮性 E-cadherin 表达增高、snail 表达降低,从而引起卵巢癌 SKOV3 细胞基质胶侵袭及裸鼠致瘤能力下降。snail 是加速肿瘤发生、发展和浸润转移、EMT 的一个重要调节因子^[8,10]。EMT 是指上皮细胞向间质细胞表型转变、并获得迁移能力的过程,其主要特征为 E-cadherin 表达降低、波形

蛋白 vimentin 表达增高。E-cadherin 表达下调的原因除启动子过度甲基化外,还存在转录抑制机制对其调控作用而引发,snail 增高,可与 E-cadherin 的启动子过度结合,抑制 E-cadherin 的基因表达^[10]。最近研究发现^[8-9],lncRNAs 通过调节 EMT 诱导基因参与 EMT 调控,其中 lncRNA HOTAIR 增高可以下调 E-cadherin 的表达、促进癌细胞 EMT 进程。肿瘤组织微环境中肿瘤细胞自分泌、旁分泌或免疫抑制细胞旁分泌的细胞因子中的转化生长因子- β (TGF- β),可以促进肿瘤细胞胞内的 snail 表达,从而抑制 E-cadherin 的表达、促进协助细胞运动的 N-cadherin、波形蛋白 vimentin 的表达,导致癌细胞迁移、侵袭及转移能力增强^[10-11]。本研究发现,EOC 中下调 lncRNA HOTAIR,可降低 snail 表达,推测可能与下调 lncRNA HOTAIR 也可降低肿瘤细胞 TGF- β 分泌有关,具体机制还有待进一步深入研究。

研究发现^[12-13],lncRNA HOTAIR 在子宫内膜癌、卵巢癌中高表达,可促进癌细胞的 EMT、转移和肿瘤干细胞的形成,与患者不良预后正相关。lncRNA HOTAIR 可促进多种肿瘤细胞的迁移、EMT 及转移^[14],并可促进肝癌干细胞、乳腺癌干细胞的形成,减少 E-cadherin 的表达、诱发 EMT,在肿瘤的生长、增殖中也发挥重要促进作用^[15-17]。肿瘤干细胞是肿瘤群体中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞,其在肿瘤生长、转移和复发中发挥重要作用^[18]。对于 lncRNA HOTAIR 的上游调控分子,研究已发现 miR-34a 及 miR-141 可以直接靶向 lncRNA HOTAIR,导致其降解、表达减少,导致肿瘤细胞的生长及侵袭转移能力下降^[19-20]。lncRNA HOTAIR 可能是恶性肿瘤增殖、EMT 及转移的重要驱动分子和调节因子^[21]。

本研究中发现,转染 shHOTAIR 的 lncRNA HOTAIR 下调组较 scramble 阴性对照组上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞中 E-cadherin 的 mRNA 表达量增加,而 E-cadherin 表达量增加将引起卵巢癌细胞黏附性增强、迁移力及侵袭能力降低^[22]。qRT-PCR、Western blot 及免疫组化检测 snail 的表达,结果显示转染 shHOTAIR 的 lncRNA HOTAIR 下调组较 scramble 阴性对照组上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞中 snail 的表达量降低,而 snail 表达量降低将会引起癌细胞 E-cadherin 表达量增加^[22]。厘清了上皮性卵巢癌中 lncRNA HOTAIR、snail 及 E-cadherin 表达的相互关系。

综上所述,利用 RNA 靶向干扰技术可定向干扰降低 EOC 细胞株 SKOV3 内 lncRNA *HOTAIR* 的表达,下调 lncRNA *HOTAIR* 表达后可导致 EOC 细胞中 snail 表达降低、E-cadherin 表达增高,并使卵巢癌细胞侵袭及裸鼠致瘤能力降低。结果提示 lncRNA *HOTAIR* 可能具有作为肿瘤分子靶向治疗靶点用于 EOC 细胞分子靶向治疗的潜在应用价值。

参 考 文 献

- [1] WU H, SHANG X, SHI Y, *et al.* Genetic variants of lncRNA *HOTAIR* and risk of epithelial ovarian cancer among Chinese women. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 41047-41052.
- [2] ZHONG Y, GAO D, HE S, *et al.* Dysregulated Expression of Long Noncoding RNAs in Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(9): 1564-1570.
- [3] TESCHENDORFF AE, LEE SH, JONES A, *et al.* *HOTAIR* and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer. *Genome Med*, 2015, 7: 108 [2017-05-06]. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0233-4>.
- [4] NIINUMA T, SUZUKI H, NOJIMA M, *et al.* Upregulation of miR-196a and *HOTAIR* drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1126-1136.
- [5] 陈登宇, 徐志本, 郑庆委. 下调 lncRNA *HOTAIR* 对胃癌细胞迁移及增殖抑制作用研究. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(8): 1081-1086.
- [6] 徐 敏, 贺红菊, 张 欢, 等. Numb 与 P53 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(1): 76-80.
- [7] ÖZES AR, MILLER DF, ÖZES ON, *et al.* NF- κ B-*HOTAIR* axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. *Oncogene*, 2016, 35(41): 5350-5361.
- [8] BATTISTELLI C, CICCHINI C, SANTANGELO L, *et al.* The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA *HOTAIR* in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 2017, 36(7): 942-955.
- [9] ZHANG J, ZHANG P, WANG L, *et al.* Long non-coding RNA *HOTAIR* in carcinogenesis and metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(1): 1-5.
- [10] YU H, SHEN Y, HONG J, *et al.* The contribution of TGF- β in epithelial-mesenchymal transition (EMT): down-regulation of E-cadherin via snail. *Neoplasma*, 2015, 62(1): 1-15.
- [11] PADUA ALVES C, FONSECA AS, MUYS BR, *et al.* Brief report: the lincRNA *HOTAIR* is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2827-2832.
- [12] LUCZAK A, SUPERNAT A, ŁAPINSKA-SZUMCZYK S, *et al.* *HOTAIR* in relation to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in molecular subtypes of endometrial cancer. *Int J Biol Markers*, 2016, 31(3): e245-e251 [2017-05-06]. <http://www.biological-markers.com/article/830badbb-8e0f-4e92-a8ce-34215598cf8a>. doi: 10.5301/ijbm.5000187.
- [13] QIU JJ, LIN YY, YE LC, *et al.* Overexpression of long non-coding RNA *HOTAIR* predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(1): 121-128.
- [14] DHAMIJA S, DIEDERICH S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer*, 2016, 139(2): 269-280.
- [15] YE P, WANG T, LIU WH, *et al.* Enhancing *HOTAIR*/MiR-10b drives normal liver stem cells toward a tendency to malignant transformation through inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Rejuvenation Res*, 2015, 18(4): 332-340.
- [16] DENG J, YANG M, JIANG R, *et al.* Long non-coding RNA *HOTAIR* regulates the proliferation, self-renewal capacity, tumor formation and migration of the cancer stem-like cell (CSC) subpopulation enriched from breast cancer cells. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170860 [2017-05-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170860>.
- [17] REN K, LI Y, LU H, *et al.* Long noncoding RNA *HOTAIR* controls cell cycle by functioning as a competing endogenous RNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Transl Oncol*, 2016, 9(6): 489-497.
- [18] LAU EY, HO NP, LEE TK. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 3714190 [2017-05-06]. <https://doi.org/10.1155/2017/3714190>.
- [19] CHIYOMARU T, YAMAMURA S, FUKUHARA S, *et al.* Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic *HOTAIR*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70372 [2017-05-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070372>.
- [20] CHIYOMARU T, FUKUHARA S, SAINI S, *et al.* Long non-coding RNA *HOTAIR* is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells. *J Biol Chem*, 2014, 289(18): 12550-12565.
- [21] DENG Q, SUN H, HE B, *et al.* Prognostic value of long non-coding RNA *HOTAIR* in various cancers. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110059 [2017-05-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110059>.
- [22] CHENG JC, CHANG HM, XIONG S, *et al.* Sprouty2 inhibits amphiregulin-induced down-regulation of E-cadherin and cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81645-81660.

(2017-09-23 收稿, 2017-12-07 修回)

编辑 沈 进