DOI:10.16016/j.1000-5404.201512025

血清中 lncRNA HOTAIR 检测方法的建立及其在结肠癌诊断中的应用价值

杨 歆,黎伯胜,胡长江,邓西尹,游 扬,常 杏,杨仕明,凌贤龙 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 建立血清中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) HOTAIR 的检测方法及评价其在结肠癌诊断中的作用。**方法** 收集结肠癌患者血清样本 47 例,正常志愿者血清样本 40 例,10 对结肠癌及癌旁组织。采用 TRIzol LS 和 TRIzol 分离组织和血清中的 RNA;采用 qRT-PCR 检测 HOTAIR 在组织及血清中的表达。**结果** 结肠癌组织或结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达显著高于癌旁组织或正常志愿者($P<0.05$, $P<0.01$),且 TNM Ⅲ/Ⅳ期的结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达高于正常志愿者($P<0.05$),Ⅲ/Ⅳ期显著高于Ⅰ/Ⅱ期 ($P<0.01$);淋巴结转移及非转移的结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达均显著高于正常志愿者($P<0.01$),且淋巴结转移患者显著高于非转移患者($P<0.05$);血清中 HOTAIR 的表达值诊断结肠癌的敏感性为 65.96%,特异性为 85.00%,曲线下面积为 0.741 0;血清中 HOTAIR 的表达与 CA199 值呈显著正相关($P<0.01$, $R^2=0.147\ 1$)。**结论** 成功建立血清中 HOTAIR 的检测方法,血清中 HOTAIR 的高表达可能作为诊断结肠癌的生物标志物。

[关键词] HOTAIR;结肠癌;血清;生物标志物

[中图法分类号] R446.11;R730.43;R735.35 [文献标志码] A

Establishment of detection method of serum lncRNA HOTAIR level and its significance in diagnosis of colon cancer

Yang Xin, Li Bosheng, Hu Changjiang, Deng Xiyin, You Yang, Chang Xin, Yang Shiming, Ling Xianlong (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish detection method of lncRNA HOTAIR expression in serum and access its significance in the diagnosis of colon cancer. **Methods** In total, 47 serum samples from identified colon cancer patients, 40 serum samples from healthy subjects and 10 pairs of colon cancer tissues and tumor-adjacent tissues were collected. Total RNAs were isolated from the serums and tissues by using TRIzol LS and TRIzol reagents. The HOTAIR expression in the serums and tissues was measured by qRT-PCR. **Results** The HOTAIR expression was significantly higher in the colon cancer tissues or serums of patients with colon cancer than in the tumor-adjacent tissues or serums of healthy subjects ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, the colon cancer patients with TNM stage Ⅲ/Ⅳ had significantly higher serum levels of HOTAIR than the healthy subjects ($P<0.05$), and the patients with TNM stage Ⅲ/Ⅳ had significantly higher serum levels of HOTAIR than ones with TNM stage Ⅰ/Ⅱ ($P<0.01$). Moreover, the colon cancer patients with or without lymph node metastasis had significantly higher serum levels of HOTAIR than the healthy subjects ($P<0.01$), and the patients with lymph node metastasis had significantly higher serum levels of HOTAIR than ones without lymph node metastasis ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of serum HOTAIR in the diagnosis of colon cancer were 65.96% and 85.00%, respectively, and the area under the receiver-operating characteristic curve (AUC) was 0.741 0. A positive correlation was observed between serum HOAIR and CA199 ($P<0.01$, $R^2=0.147\ 1$). **Conclusion** The method for the detection of serum HOTAIR is successfully established,

[通信作者] 凌贤龙,E-mail:linxianlong@yeah.net

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1434.035.html(2016-02-01)

and the serum HOTAIR may serve as a novel noninvasive biomarker for the diagnosis of colon cancer.

[**Key words**] HOTAIR; colon cancer; serum; biomarker

Corresponding author: Ling Xianlong, E-mail: linxianlong@yeah.net

结肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一[1]。早期结肠癌患者5年生存率可达90%,但对于晚期结肠癌,患者生存率仅为10%~15%[2]。因此,提高结肠癌早期诊断的效率是减少结肠癌患者死亡的关键环节。目前用于筛查结肠癌的分子标志物主要为糖链抗原(carbohydrate antigen, CA)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)等。尽管这些分子标志物能较好地诊断晚期结肠癌,但对于早期结肠癌的诊断,其敏感性和特异性均较低[3]。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度200~100 000 nt的单链RNA分子,不编码蛋白[4]。近年来,大量的研究表明lncRNA的表达失调与肿瘤的复发、转移以及患者的预后密切相关[5-7]。一些研究也指出lncRNA可能作为一类新的诊断癌症的生物标志物,如HOTAIR[8]、ncRuPAR[9]。已有研究表明在结肠癌组织中上调的lncRNAs,如CCAT1[10]、HOTAIR[11]、H19[12]。然而,少有文献报道血清中lncRNA的检测方法以及血清中lncRNA表达谱在结肠癌诊断中的应用[13]。因此,本研究拟从已报道的结肠癌组织中高表达的lncRNA HOTAIR出发,分析结肠癌患者血清中HOTAIR的表达及其在结肠癌诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

纳入标准:(1)年龄20~80岁,患者或家属同意;(2)活检或者手术证实为结肠癌(结肠癌组);(3)经内镜、CT、病理等辅助检查确定志愿者无结肠癌及癌前病变,无任何恶性肿瘤、感染性疾病、高血压、高血脂、糖尿病等病史。排除标准:(1)接受结直肠癌手术治疗或者放化疗后的患者;(2)转移性结肠癌。样本取自2014年7月至2015年11月期间在第三军医大学新桥医院消化内科与普通外科住院的结肠癌患者及志愿者,在纳入排除标准下共收集到10对结肠癌及癌旁组织,47例结肠癌患者血清及40例正常健康志愿者血清。10例结肠癌组织标本中,男性7例,女性3例,平均年龄63.4(46~80)岁;47例结肠癌血清样本中,男性31例,女性16例,平均年龄58.98(33~80)岁;40例志愿者血清样本中,男性25例,女性15例,平均年龄59.07(26~77)岁。见表1。对于组织样本,所取癌旁组织与癌组织边缘的距离>5 cm,将组织剪成小块后,立即冻存于液氮中。对于血清样本,收集患者及志愿者5 mL全血,1 000 r/min离心15 min,吸取血清至1.5 mL无酶离心管中,12 000 r/min离心5 min,吸取血清至新的1.5 mL无酶离心管中,-80 ℃保存。本研究符合第三军医大学新桥医院伦理委员会要求。

1.2 RNA提取

采用TRIzol LS试剂(美国Invitrogen公司)提取血清中的RNA。按照3∶1的比例加入750 μL TRIzol LS和250 μL血清样品,加入10 μL 50 nmol/L的Cel-miR-39[14],充分混匀,加入200 μL氯仿,混匀,静置10 mim,12 000 r/min离心15 min,吸取上清液于另一新的1.5 mL无酶离心管中,加入400 μL异丙醇,混匀,静置8 min,12 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入1 mL 75%乙醇洗涤,7 500 r/min离心5 min,弃上清液,重复离心,用10 μL移液器汲出多余的乙醇,用20 μL 65 ℃无酶水溶解RNA,冻存于-80 ℃。采用TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)提取组织中的RNA。先用液氮将组织碾碎,按照50~100 mg组织加入1 mL TRIzol的比例加入试剂,混匀,根据试剂说明书进行提取,用35 μL 65℃无酶水溶解RNA,冻存于-80℃。

表1 各组研究对象的临床资料比较

组别	总例数	男(例)	女(例)	平均年龄(岁)	CA199(例)		分化类型(例)			T分期(例)				N分期(例)				M分期(例)	
					<37 (U/mL)	≥37 (U/mL)	高	中	低	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3	M0	M1
结肠癌组织标本组	10	7	3	63.4	5	5	0	6	4	0	2	3	5	2	6	2	0	7	3
结肠癌血清样本组	47	31	16	58.98	30	17	10	26	11	2	7	16	22	13	18	12	4	37	10
正常志愿者血清组	40	25	15	59.07	40	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.3 qRT-PCR

采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂(大连 TaKaRa 公司)对总 RNA 进行逆转录,每 20 μL 体系逆转录 1 μg RNA,逆转录反应试剂及步骤:加入 7 μL 60 ng/μL RNA(血清中 RNA 含量较少,约 60 ng/μL)、2 μL 5 × gDNA Eraser buffer、1 μL gDNA Eraser,混匀,45 ℃反应 1 min,继续加入 4 μL 5 × PrimeScript Enzyme Buffer、1 μL PrimeScript Enzyme、1 μL PrimeScript RT Mix,4 μL Nuclease-free H_2O,混匀,37 ℃反应 15 min,获得 cDNAs。采用 SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ 试剂(大连 TaKaRa 公司)对合成的 cDNA 进行扩增,反应体系为 10 μL,qPCR 反应试剂及步骤:加入 5 μL 2 × SYBR® Premix *Ex Taq*™、0.2 μL Primer Forward (10 pmol/μL)、0.2 μL Primer Reverse (10 pmol/μL)、0.2 μL ROX Dye Ⅱ、2.4 μL Nuclease-free H_2O,混匀,采用 ABI step one 进行扩增,反应条件为:95 ℃反应 2 min,40 个循环于 95 ℃反应 15 s、58 ℃ 反应 30 s,在 58 ℃时采集荧光;溶解温度,从58 ℃ 逐渐增加至 95 ℃,每增加 0.5 ℃采集 1 次荧光。HOTAIR 的 5 对不同区段的引物如下:P1 上游引物 5′-CGCTTCGCAGTGGAATGGAA-3′, P1 下游引物 5′-CC-GTGGCA-TTTCTGGTCTTGT-3′; P2 上游引物 5′-AAGACGGGCA-CTCACAGACA-3′, P2 下游引物 5′-AGC-GTTCTCTGGGCGTTCAT-3′; P3 上游引物 5′-ACAGAGTCCGTTCAGTGTCAGA-3′, P3 下游引物 5′-ATT-GGGCTGG-GTCTACACAAGT-3′; P4 上游引物 5′-TGC-TTCGTGCTGATTCCTAGAC-3′, P4 下游引物 5′-TTGC-TCTGTGCTGCCAGTTAG-3′; P5 上游引物 5′-GCCTGAACTTCCTCCTGCTATT-3′, P5 下游引物 5′-ACAC-AAAGTGCATACCTACCCA-3′。GAPDH 的引物如下:上游 5′-TGAAGGTCGGAGTCAACG GATT-3′, 下游 5′-CTCGCTCCTGGAAGATG GTGAT-3′。Cel-miR-39 的逆转录引物及 PCR 引物均购于上海吉玛公司。

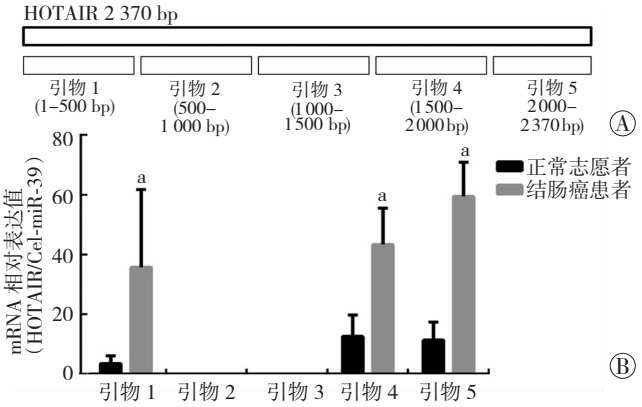
1.4 统计学处理

Mann-Whitney test 用于比较结肠癌患者和正常志愿者血清中 HOTAIR 的表达;配对 *t* 检验用于比较结肠癌和癌旁组织中 HOTAIR 的表达;工作特征曲线(receiver-operating characteristic, ROC)用于分析血清中 HOTAIR 的表达值在结肠癌诊断中的意义;约登指数用于分析最佳切点值;Pearson 相关性分析获得 HOTAIR 的表达值与 CA199 值的相关性;所有统计在 GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Software Inc, Caligornia)软件上进行。

2 结果

2.1 LncRNA HOTAIR 片段在血清中的表达检测

由于 HOTAIR 的长度较长(2 370 bp),可能以片段形式存在于外周血中,所以我们设计了 5 对引物检测 HOTAIR 在血清中的表达,这 5 对引物分别针对 HOTAIR 的不同区段进行检测(图 1A)。采用这 5 对引物分别检测 5 例正常志愿者和 5 例结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达,发现 Primer 1,4,5 均能检测到 HOTAIR 在血清中的表达,且结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达显著高于正常志愿者($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)而 Primer 2,3 未能检测到 HOTAIR 的表达(图 1B)。因为 Primer 5 所检测到的 HOTAIR 表达差异有统计学意义,所以我们采用这对引物进行后续的研究。



A:针对 HOTAIR 全长(2 370 bp)设计 5 对引物,扩增血清中 HOTAIR 不同区段的表达;B:引物 1,3,5 均能检出结肠癌患者及正常志愿者血清中 HOTAIR 片段的表达,且两者差异有统计学意义;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常志愿者比较

图 1 LncRNA HOTAIR 不同区段的引物设计及验证

2.2 LncRNA HOTAIR 片段在结肠癌患者血清中高表达

为明确采用 Primer 5 检测的 HOTAIR 在结肠癌组织及患者血清中的表达,我们收集了 10 例结肠癌和癌旁组织样本,以及 47 例结肠癌患者血清和 40 例正常志愿者血清样本。结果显示,10 例组织样本中,8 例结肠癌组织中 HOTAIR 呈显著高表达($P<0.05$,图 2A),且结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达显著高于正常志愿者($P<0.01$,图 2B)。进一步采用工作特征曲线分析,发现血清中 HOTAIR 的表达值大于 13.30 时诊断结肠癌的敏感性为 65.96%,特异性为 85.00%,曲线下面积为 0.7410 (图 2C),提示血清中 HOTAIR 的表达值可能用于检测结肠癌。

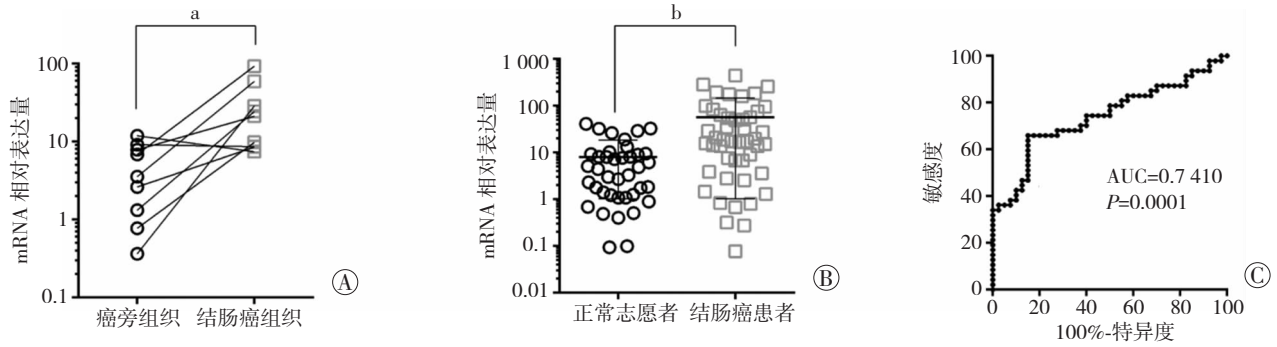
2.3 血清中 lncRNA HOTAIR 的表达与结肠癌 TNM 分期,淋巴结转移及 CA-199 值相关

为进一步明确血清中 HOTAIR 的表达在诊断结肠癌中的意义,我们分析了其与患者临床资料的相关性,发现 TNM Ⅰ/Ⅱ期与结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达差异无统计学意义($P=0.106\ 1$),而Ⅲ/Ⅳ期患者

显著高于正常志愿者($P=0.000\ 2$),且Ⅲ/Ⅳ期显著高于Ⅰ/Ⅱ期($P<0.05$,图3A)。同时,淋巴结转移及非转移的结肠癌患者血清中HOTAIR的表达显著高于正常志愿者($P<0.01$, $P<0.000\ 1$),且淋巴结转移患者显著高于非转移患者($P<0.05$,图3B)。进一步分析血清中HOTAIR的表达与CA199值的相关性,发现二者呈显著正相关($P<0.01$, $R^2=0.147\ 1$,图3C)。

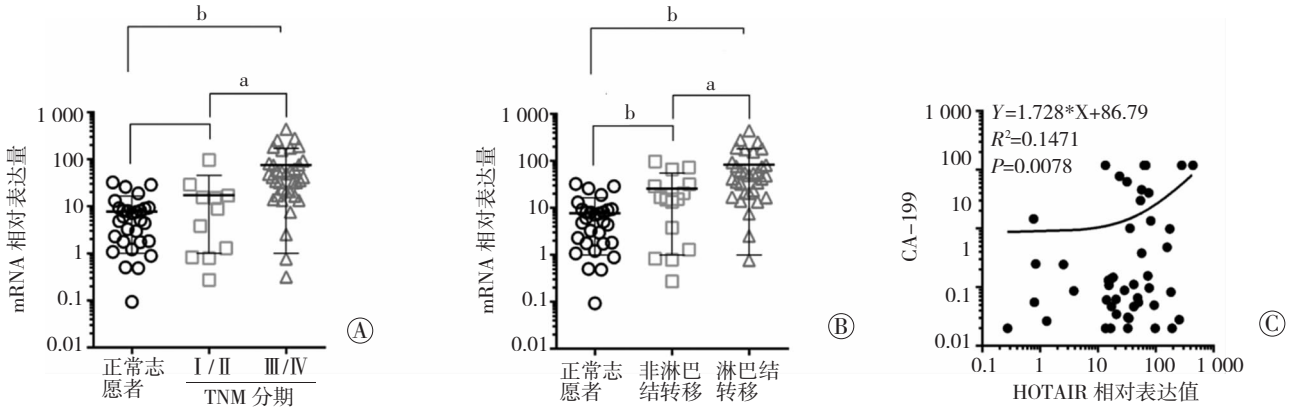
2.4　血清中lncRNA HOTAIR的表达较稳定

为明确Primer 5检测片段稳定存在于血清中,我们分别行室温放置数天和反复冻融数次后观察HOTAIR片段的稳定性,结果发现,采用Primer 5检测的HOTAIR片段稳定地存在于结肠癌患者血清中(图4A、B)。



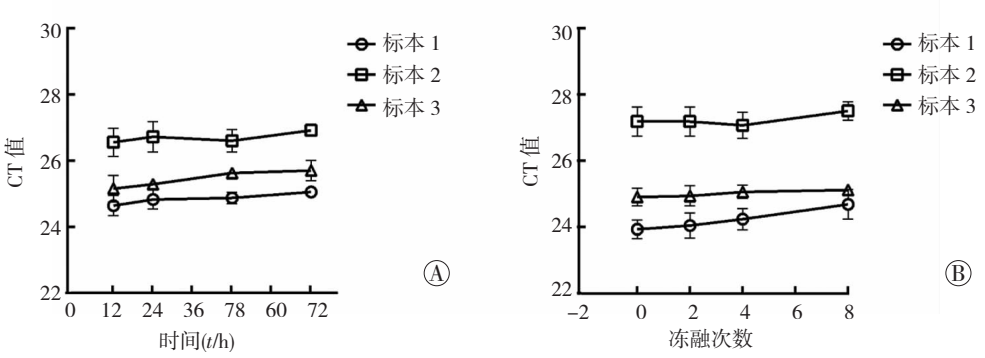
A:结肠癌组织中HOTAIR的表达　a:$P<0.05$,与癌旁组织比较;B:结肠癌患者血清中HOTAIR的表达　b:$P<0.01$,与正常志愿者血清比较;C:结肠癌患者血清样本中敏感性和特异性的相关性分析

图2　结肠癌患者血清中LncRNA HOTAIR的表达



A:结肠癌患者血清HOTAIR的表达　a:$P<0.05$,与Ⅰ/Ⅱ期比较; b:$P<0.01$,与正常志愿者比较;B:淋巴结转移及非转移的结肠癌患者血清中HOTAIR的表达　a:$P<0.05$,与非淋巴结转移比较; b:$P<0.01$,与正常志愿者比较;C:结肠癌患者血清中CA199与HOTAIR表达值的相关性分析

图3　结肠癌患者血清中LncRNA HOTAIR的表达与临床指标的相关性分析



A:不同时间检测结肠癌患者血清中HOTAIR的表达;B:不同冻融次数检测结肠癌患者血清中HOTAIR的表达

图4　结肠癌患者血清中LncRNA HOTAIR的稳定性分析

3 讨论

近年来,研究表明 HOTAIR 在消化系统肿瘤中高表达,但少有文献分析 HOTAIR 在结肠癌组织及患者血清中的表达情况[8,15-18]。Svoboda 等[19]研究发现 HOTAIR 在结肠癌患者外周血中呈高表达且与患者不良预后密切相关,但其指出 HOTAIR 在外周血中的表达尽管差异有统计学意义,但不显著。最近的研究表明,因为 lncRNA 的长度较长,导致其容易断裂或不稳定,所以可能主要以片段的形式存在于外周血中,而 Wang 等[20]的研究采用多对引物对 lncRNA 进行扩增后,发现 lncRNA 的部分片段呈高表达且稳定地存在于外周血中。因此,本研究设计了 5 对针对 HOTAIR 不同区段的引物,结果发现 Primer 5 的扩增效果最为明显,而 Primer 2,3 都未能检测出 HOTAIR 在血清中的表达,提示 HOTAIR 在血清中可能以片段形式存在。

采用 Primer 5 检测 HOTAIR 在组织中的表达,发现大部分组织中 HOTAIR 呈高表达,与其在其他消化系统肿瘤中的表达情况一致,但 Svoboda 等[19]研究表明 HOTAIR 的表达在结肠癌组织与结肠正常黏膜之间差异没有统计学意义,可能与其采用的结肠正常黏膜组织或扩增引物有关,也可能和我们采用的结肠癌组织样本较少有关。进一步采用较大样本检测发现 HOTAIR 在结肠癌患者血清中呈显著高表达,这与 Svoboda等[19]的研究结果一致,不同的是本研究中 HOTAIR 的表达在评估结肠癌诊断中有较高敏感性和特异性,提示血清中 HOTAIR 的高表达可能是诊断结肠癌潜在生物标志,而得出这样的结论可能与不同人群的样本,以及采用不同的 PCR 引物有关。

本研究进一步分析发现血清中 HOTAIR 的表达与结肠癌 TNM 分期,淋巴结转移及 CA199 值密切相关。Wu 等[11]研究发现 HOTAIR 在结肠癌组织中显著高表达,且与淋巴结转移,患者不良生存率等密切相关,并指出 HOTAIR 的表达影响结肠癌细胞的表皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。这些结论均支持我们的观点,即 HOTAIR 的表达与结肠癌转移密切相关。不同的是,我们分析结肠癌患者血清中 HOTAIR 的表达,其意义在于可以通过非侵袭性方式获得 HOTAIR 的表达值,进而对结肠癌诊断进行评估。本研究还发现血清中 HOTAIR 的表达与 CA199 值存在显著的正相关,提示血清中 HOTAIR 的表达值可能与 CA199 对结肠癌进行联合诊断,进而提高诊断准确率。

通过对血清中 HOTAIR 的稳定性分析发现,不管是在室温放置数天或者反复冻融数次的情况下,HOTAIR的表达均比较稳定,表明采用 HOTAIR Primer 5 能够稳定地检测 HOTAIR 在血清中的表达。由于本研究采用的患者样本数量较少,以及收集的样本时间较短,所以其他的临床指标未能分析,以及血清中 HOTAIR的表达与患者生存率的相关性未能分析。因此,在下一步研究中,我们将扩大样本量,进一步分析血清中 HOTAIR 的表达值在诊断结肠癌或患者预后判断中的意义。

综上所述,本研究建立了稳定检测血清中 HOTAIR 表达的方法,检测发现结肠癌患者血清中HOTAIR的表达显著高于正常志愿者,且与结肠癌 TNM 分期,淋巴结转移及 CA199 值密切相关,提示血清中 HOTAIR 的表达值可能作为生物标志诊断结肠癌。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29. DOI:10.3322/caac.20138

[2] Yokota J. Tumor progression and metastasis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 497-503.

[3] Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, *et al*. Cancer antigens (CEA and CA199) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma[J]. Med Arh, 2013, 67(6): 397-401. DOI:10.5455/medarh.2013.67.397-401

[4] Volders P J, Helsens K, Wang X, *et al*. LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D246-D251. DOI:10.1093/nar/gks915

[5] Glover A R, Zhao J T, Ip J C, *et al*. Long noncoding RNA profiles of adrenocortical cancer can be used to predict recurrence[J]. Endocr Relat Cancer, 2015, 22(1): 99-109. DOI:10.1530/ERC-14-0457

[6] Liu B, Sun L, Liu Q, *et al*. A cytoplasmic NF-κB interacting long noncoding RNA blocks $I_{\kappa}B$ phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis[J]. Cancer Cell, 2015, 27(3): 370-381. DOI:10.1016/j.ccell.2015.02.004

[7] Han L, Zhang E B, Yin D D, *et al*. Low expression of long noncoding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of non-small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1665. DOI:10.1038/cddis.2015.30

[8] Lv X B, Lian G Y, Wang H R, *et al*. Long noncoding RNA HOTAIR is a prognostic marker for esophageal squamous cell

carcinoma progression and survival[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63516. DOI:10.1371/journal.pone.0063516

[9] Liu L, Yan B, Yang Z, *et al*. ncRuPAR inhibits gastric cancer progression by down-regulating protease-activated receptor-1[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 7821 - 7829. DOI:10.1007/s13277-014-2042-6

[10] Xiang J F, Yin Q F, Chen T, *et al*. Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus[J]. Cell Res, 2014, 24(5): 513 - 531. DOI:10.1038/cr.2014.35

[11] Wu Z H, Wang X L, Tang H M, *et al*. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 395 - 402. DOI:10.3892/or.2014.3186

[12] Tsang W P, Ng E K, Ng S S, *et al*. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 350 - 358. DOI:10.1093/carcin/bgp181

[13] Zeng S, Xiao Y F, Tang B, *et al*. Long Noncoding RNA in Digestive Tract Cancers: Function, Mechanism, and Potential Biomarker[J]. Oncologist, 2015, 20(8): 898 - 906. DOI:10.1634/theoncologist.2014-0475

[14] Li B S, Zhao Y L, Guo G, *et al*. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41629. DOI:10.1371/journal.pone.0041629

[15] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, *et al*. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(13): 1616 - 1625. DOI:10.1038/onc.2012.193

[16] Du M, Wang W, Jin H, *et al*. The association analysis of lncRNA HOTAIR genetic variants and gastric cancer risk in a Chinese population[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31255 - 31262. DOI:10.18632/oncotarget.5158

[17] 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]. PLoS One, 2013, 8(10): e77070. DOI:10.1371/journal.pone.0077070

[18] Chen F J, Sun M, Li S Q, *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. DOI:10.1002/mc.21944

[19] Svoboda M, Slyskova J, Schneiderova M, *et al*. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(7): 1510 - 1515. DOI:10.1093/carcin/bgu055

[20] Wang Y, Li Z, Zheng S, *et al*. Expression profile of long non-coding RNAs in pancreatic cancer and their clinical significance as biomarkers[J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 35684 - 35698. DOI:10.18632/oncotarget.5533

(收稿:2015-12-03;修回:2016-01-19)

(编辑 王 红)