

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.022

胃癌组织中 MEG3 基因甲基化状态及其临床意义*

晏江 过晓强 夏加增[△] 顾琛

(南京医科大学附属无锡第二医院普外科 江苏 无锡 214002)

摘要 目的:探讨胃癌中 MEG3 基因差异性甲基化区域甲基化水平及其与 MEG3 表达之间的关系,并分析其临床病理意义。**方法:**利用荧光定量 PCR 检测 38 例胃癌组织及其对应癌旁正常组织中 MEG3 的表达水平,并利用甲基化特异性 PCR 检测 MEG3 基因差异性甲基化区域的甲基化水平。**结果:**①胃癌组织中 MEG3 表达水平明显低于正常癌旁对照组织($P < 0.05$);②胃癌组织 MEG3 差异性甲基化区域的甲基化率(21/38,55.3%)显著高于正常对照组织(10/38,26.3%, $P < 0.05$)③胃癌组织 MEG3 差异性甲基化区域的甲基化率在性别、年龄、发病部位的差异无统计学意义($P > 0.05$);在肿瘤的大小,淋巴结转移,浸润深度上差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**胃癌组织中 MEG3 呈低表达水平,其差异性甲基化区域的甲基化与肿瘤的大小,淋巴结转移,浸润深度有关。

关键词:胃癌;MEG3;长链非编码 RNA;甲基化

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2289-04

Methylation Level of MEG3 Differentially Methylated Regions in Gastric Cancer and its Clinical Significance*

YAN Jiang, GUO Xiao-qiang, XIA Jia-zeng[△], GU Chen

(Department of General Surgery, Nanjing medical University Affiliated Wuxi Second Hospital, Wuxi, Jiangsu, 214002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of Maternally expressed gene 3 (MEG3) and clinical significance of hypermethylation of MEG3 differentially methylated regions (DMR) in gastric cancer tissues. **Methods:** Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of MEG3 in 38 gastric cancer tissues. Methylation-specific PCR (MSP) was performed to analyze the methylation statue of MEG3 DMR. **Results:** ① The expression of MEG3 decreased in gastric cancer tissues. ② The methylation rate of MEG3 DMR was increased significantly in tumor tissues (21/38,55.3%) compared with that in the normal tissues (10/38,26.3%, $P < 0.05$). ③ The positive rate of MEG3 DMR methylation was closely related with the tumor size, lymph node metastasis and depth of invasion ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression level of MEG3 decreased in gastric cancer tissues, and the aberrant methylation statue of MEG3 DMR was correlated with the tumor size, lymph node metastasis and depth of invasion.

Key words: Gastric cancer; MEG3; Long non-coding RNA; Methylation

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2289-04

前言

母系表达基因 3(Maternally expressed gene 3,MEG3)编码基因位于 14q32 号染色体,长 1855bp,缺乏有意义的开放阅读框架,不能编码蛋白质,属于长链非编码 RNA^[1]。早在 2003 年,哈佛医学院麻省总医院神经内分泌实验室就已发现 MEG 在垂体瘤等脑肿瘤中以及其他一些肿瘤细胞系中表达沉默,且将 MEG3 转染到 Hela, MCF-7, H4 等人类肿瘤细胞系后,有明显抑制肿瘤细胞增殖的现象,证实 MEG3 发挥着抑癌基因的功能^[2]。随后,随着对于 MEG3 的研究的深入,其在肺癌^[3]、肝癌^[4]、肾癌^[5]、急性慢性白血病^[6]、宫颈癌^[7]等多种肿瘤内的异常低表达被逐渐发现,而其中多数研究均认为 MEG3 在此类肿瘤中低表达与其编码基因的差异性甲基化区域(DMR)异常甲基化密

切相关^[4,6,8-10]。本研究通过实时荧光定量 PCR 证实 MEG3 mRNA 在胃癌中低表达,并通过甲基化特异性 PCR 探讨 MEG3 差异性甲基化区域的甲基化水平及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 1 月至 2012 年 12 月就诊于南京医科大学附属无锡第二医院普外科需进行手术切除的胃癌标本 38 例,患者平均年龄 63(28-80)岁,术前均未行任何放化疗,同时取距肿瘤病灶边缘 5 cm 以上的胃黏膜作为对照。所有组织病理类型诊断标准参照国际抗癌联盟第 7 版 TNM 分期。

1.2 RNA 的提取与荧光定量 PCR

使用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)从胃癌标本及相

* 基金项目:江苏省六大人才高峰项目(2011-WSK-013)

作者简介:晏江(1988-),男,硕士,主要研究方向:胃癌发生机制研究,E-mail:yanjiang103@gmail.com

△ 通讯作者:夏加增,主任医师,副教授,博士,电话:0510-66681584,E-mail:jiaazengxia@yahoo.com

(收稿日期:2013-12-10 接受日期:2014-01-09)

应的癌旁正常胃组织中提取总 RNA, 并用 Takara PrimeScript RT Master Mix kit 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)将总 RNA 逆转录为 cDNA, 稀释 5 倍后用于下步荧光定量 PCR 反应。荧光定量 PCR 采用 ABI stepone plus 实时荧光定量 PCR 仪, 使用 Qiagen Quantifast SYBR Green PCR Kit 试剂盒(购自杭州联科生物), 反应条件如下: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 扩增 40 个周期。MEG3 扩增引物为: 上游, 5'-CCTCTCAT GCTGAGCTGCT3'; 下游, 5'-TGTTGGTGGGATC-CA-GGAAA3'^[11], 选取 β -actin 为内参。

1.3 DNA 的提取与 DNA 甲基化修饰、纯化

按照说明书, 使用 Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit 试剂盒(南京生兴生物科技有限公司)分别提取胃癌标本及其对应癌旁正常组织的基因组 DNA。提取后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并用紫外分光光度计测定 DNA 纯度和密度。DNA 产物使用 Qiagen Epitect Bisulfite Kit 试剂盒(购自杭州联科生物科技公司)进行亚硫酸氢钠修饰及纯化, 修饰纯化产物置于 -20 ℃ 冰箱长期保存。

1.4 甲基化特异性 PCR(MSP)

将修饰纯化后的 DNA 作为模板, 使用 TaKaRa Ex Taq Hot Start Version 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司), 按照试剂说明书进行扩增。甲基化片段扩增产物大小为 160bp, 非甲基化片段扩增产物大小为 120bp。PCR 扩增甲基化引物为: 上游, 5'-GTTAGTAATCGGGTTTGTCTCGGC3'; 下游, 5'-AATCATAACTC-

CGAACACCCGCG3'。非甲基化引物为: 上游, 5'-GAGGATG-GTTAGTTATTGGGGT3'; 下游, 5'-CCACCATAACCAACACC-CTAT-AATCACA3'^[10]。扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。在 DMR 高甲基化的组织中只显示甲基化的条带(160bp), 而在甲基化正常的组织中甲基化条带及非甲基化条带(120bp)都能被检测到^[6]。

1.5 统计学分析

计量材料采用均数 $\pm$ 标准差表示。数据计算分析采用 SPSS18.0 软件。两组间均数比较采用 t 检验; 计数资料采用 Fisher 确切概率法检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌标本中 MEG3 表达情况

用荧光定量 PCR 检测 38 例胃癌组织及其对应的癌旁正常组织中 MEG3 相对表达水平, 结果显示 30 例胃癌组中 MEG3 表达量下降。胃癌组中 MEG3 相对表达量(Δ CT=8.061 $\pm$ 1.461)明显低于其在对应的癌旁组织中的表达量(Δ CT=6.438 $\pm$ 2.015)(P<0.01)。

2.2 MEG3 DMR 甲基化检测结果

全部 38 例胃癌组织及其对应癌旁正常组织均成功进行了 MEG3 基因差异性甲基化区域的 MSP 分析, 见图 1。MEG3 DMR 在胃癌组织中的甲基化率为 55.3% (21/38), 显著高于癌旁正常组织中的甲基化率 26.3% (10/38)(P<0.05)。

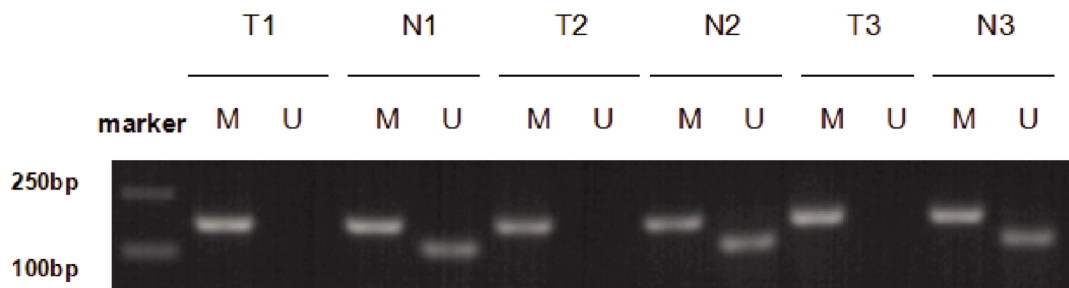


图 1 MEG3 在胃癌组织及其对应癌旁组织中 DMR 甲基化状态的电泳图

注: T= 肿瘤组织, N= 癌旁正常组织, M= 甲基化条带, U= 非甲基化条带

Fig.1 Methylation level of MEG3 differentially methylated regions in gastric cancer tissues and their compared normal tissues.

Note: T= gastric tumor, N= normal gastric tissue. M= methylated, U= unmethylated

2.3 MEG3 DMR 甲基化状态与临床病理的关系

胃癌组中 MEG3 DMR 甲基化与肿瘤的大小, 淋巴结转移, 浸润深度上差异有统计学意义(P<0.05), 而在性别、年龄、肿瘤部位、分化程度上差异无统计学意义(P>0.05), 见表 1。

3 讨论

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 目前越来越多的证据表明长链非编码 RNA 在基因转录翻译、细胞分化、表观遗传等生命活动中均发挥了重要的调控作用^[12-15]。但与微小 RNA(microRNA)相比, 对于长链非编码 RNA 的研究仍处于相对陌生的领域。

作为长链非编码 RNA 家族的一员, MEG3 的抑癌因子的角色近期已经在多种肿瘤中被证实^[4,6,16], MEG3 能通过促进

P53 蛋白表达来抑制肿瘤细胞增殖^[17], 还可通过 Rb 和 p16INK4A 途径抑制细胞的增殖^[18]、通过调节 VEGF 以及 Notch 信号传导途径抑制血管的生成, 从而参与调节细胞凋亡、增殖、分化等生命活动^[19]。Sun 等人发现在胃癌中 MEG3 呈明显的低表达并且与病人的临床预后明显相关, 而在用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理过的胃癌细胞系中 MEG3 的表达量明显上升, 提示 MEG3 的调控与 DNA 甲基化密切相关^[20]。在之前的另一个实验中, Braconi 等在肝癌细胞系也发现了 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后 MEG3 的表达量的升高, 并且他们在干扰 DNA 甲基化转移酶 1(DNMT-1)与 DNA 甲基化转移酶 3B(DNMT-3B)之后, 发现 MEG3 表达量有着明显上升, 进一步证实了 DNA 甲基化在调控 MEG3 表达中的重要作用^[21]。但在胃癌中, MEG3 的表达与其基因甲基化的状态的相互关系目前仍缺少更深入的研究。

表 1 MEG3 DMR 甲基化与临床病理因素的关系

Table 1 The relationship between the methylation of MEG3 DMR and clinicopathologic features

Clinical Parameter	Case	Methylation of MEG3 DMR(Case)		P value (Fisher's exact test)
		Methylated	Unmethylated	
Gender				
Male	28	17	11	0.223
Female	10	4	6	
Age(years)				
<60	11	4	7	0.128
≥ 60	27	17	10	
Location				
Sinus Ventriculi	23	14	9	0.299
Corpus or Fundus Ventriculi	15	7	8	
Size				
<5 cm	21	8	13	0.020
≥ 5cm	17	13	4	
Histological differentiation				
Poorly	23	12	11	0.445
Well or Moderately	15	9	6	
Lymphatic metastasis				
Yes	16	12	4	0.038
No	22	9	13	
Invasion depth				
T1-2	14	4	10	0.014
T3-4	24	17	7	

本研究运用荧光定量 PCR 再次证实胃癌中 MEG3 的表达水平显著下调,与正常对照组相比统计学差异显著。随后 MSP 检测发现胃癌组中有 21 例(55.3%,21/38)存在 MEG3 DMR 的高甲基化,癌旁正常组织中有 10 例(26.3%,10/38)MEG3 DMR 甲基化程度变高,MEG3 基因 DMR 异常甲基化在这两种组织中的发生率差异有统计学意义,提示 MEG3 低表达与其 DMR 异常甲基化可能相关。本研究还发现 MEG3 DMR 甲基化状态在肿瘤大小,淋巴结转移,浸润深度上有统计学差异,提示 MEG3 DMR 甲基化状态可能与胃癌的发展有关。

本研究证实了胃癌组织中 MEG3 基因 DMR 异常甲基化在胃癌发生发展中起着重要作用,但目前对于 MEG3 基因 DMR 异常甲基化在胃癌中的作用机制还处于初级阶段,还有待更多研究者参与相关研究。

参考文献(References)

- [1] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor[J]. J Mol Endocrinol, 2012, 48(3): R45-53
- [2] Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(11): 5119-5126
- [3] Lu KH, Li W, Liu XH, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression[J]. BMC Cancer, 2013, 13: 461
- [4] Anwar SL, Krech T, Hasemeier B, et al. Loss of imprinting and allelic switching at the DLK1-MEG3 locus in human hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49462
- [5] Kawakami T, Chano T, Minami K, et al. Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(6): 821-830
- [6] Benetatos L, Hatzimichael E, Dasoula A, et al. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes [J]. Leuk Res, 2010, 34(2): 148-153
- [7] Qin R, Chen Z, Ding Y, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits the proliferation of cervical carcinoma cells through the induction of cell cycle arrest and apoptosis[J]. Neoplasma, 2013, 60(5): 486-492
- [8] McMurray EN, Schmidt JV. Identification of imprinting regulators at the Meg3 differentially methylated region [J]. Genomics, 2012, 100(3): 184-194
- [9] Zhang X, Gejman R, Mahta A, et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression[J]. Cancer Res, 2010, 70(6): 2350-2358
- [10] Balik V, Srovnal J, Sulla I, et al. MEG3: a novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas [J]. J Neurooncol, 2013, 112(1): 1-8
- [11] Hubertus J, Lacher M, Rottenkolber M, et al. Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors[J]. Oncol Rep, 2011, 25(3): 817-823
- [12] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. Cancer Lett, 2013, 339(2):159-166
- [13] Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs [J]. Science, 2012, 338(6113): 1435-1439

- [14] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298-1307
- [15] 左君波, 朱阿考, 夏加增. 长链非编码 RNA 与肿瘤的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(47): 3380-3382
- Zuo Jun-bo, Zhu A-kao, Xia Jia-zeng. The Research of Long Non-coding RNA in Tumorigenesis [J]. *National Medical Journal of China*, 2011, 91(47): 3380-3382
- [16] Ying L, Huang Y, Chen H, et al. Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer [J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(3): 407-411
- [17] Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24731-24742
- [18] Zhang X, Zhou Y, Klibanski A. Isolation and characterization of novel pituitary tumor related genes: a cDNA representational difference approach[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 326(1-2): 40-47
- [19] Gordon FE, Nutt CL, Cheunsuchon P, et al. Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2443-2452
- [20] Sun M, Xia R, Jin F, et al. Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013, [Epub ahead of print]
- [21] Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer[J]. *Oncogene*, 2011, 30(47): 4750-4756

(上接第 2273 页)

- [9] Mizouni H, Arous Y, Hedhli M, et al. Multi slice computerized tomography of the heart and coronary arteries [J]. *Tunis Med*, 2012, 90(3): 201-204
- [10] Groen JM, Greuter MJ, Vliegenthart R, et al. Calcium scoring using 64-slice MDCT, dual source CT and EBT: a comparative phantom study[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2008, 24(5): 547-56
- [11] Dijkstra H, Greuter MJ, Groen JM, et al. Coronary calcium mass scores measured by identical 64-slice MDCT scanners are comparable: a cardiac phantom study [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2010, 26(1): 89-98
- [12] Sun ZH, Cao Y, Li HF, et al. Multislice computed tomography angiography in the diagnosis of coronary artery disease [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2011, 8(2): 104-113
- [13] Lee TH, Lee J, Lee H, et al. Fast perspective volume ray casting method using GPU-based acceleration techniques for translucency rendering in 3D endoluminal CT colonography[J]. *Comput Biol Med*, 2009, 39(8): 657-666
- [14] Shabestari AA, Akhlaghpour S, Tayebivaljozi R, et al. Prevalence of congenital coronary artery anomalies and variants in 2697 consecutive patients using 64-detector row coronary CT angiography [J]. *Iran J Radiol*, 2012, 9(3): 111-121
- [15] Liu CP, Lin YH, Lin MS, et al. Evaluation of myocardial infarction patients after coronary revascularization by dual-phase multi-detector computed tomography: Now and in future [J]. *World J Cardiol*, 2013, 5(4): 115-118
- [16] Yang S, Zeng MS, Zhang ZY, et al. Sixty-four-multi-detector computed tomography diagnosis of coronary artery anomalies in 66 patients[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(7): 838-842
- [17] Ruzsics B, Lee H, Zwerner PL, et al. Eur Radiol. Dual-energy CT of the heart for diagnosing coronary artery stenosis and myocardial ischemia-initial experience[J]. *Eur Radiol*, 2008, 18(11): 2414-2424
- [18] 王照谦, 朱皓, 方唯一等. 多层螺旋 CT 显示冠状动脉狭窄的初步临床应用[J]. *诊断学理论与实践*, 2004, 3(3): 154-157
- Wang Zhao-qian, Zhu Hao, Fang Wei-yi, et al. Multislice CT showed the preliminary clinical application of coronary artery stenosis [J]. *Journal of Diagnostics*, 2004, 3(3): 154-157
- [19] Jinzaki M, Tanami Y, Yamada M, et al. Progress and Current State of Coronary CT[J]. *Ann Vasc Dis*, 2011, 4(1): 7-18
- [20] Sahiner L, Canpolat U, Aytemir K, et al. Diagnostic accuracy of 16-versus 64-slice multidetector computed tomography angiography in the evaluation of coronary artery bypass grafts: a comparative study [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2012, 15(5): 847-853