

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.015

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA XLOC_002319 在食管鳞癌中表达及其甲基化状态

梁佳¹, 邴钢¹, 刘胜男¹, 郭炜¹, 沈素朋¹, 丁春艳¹, 李慧杰², 董稚明¹(1. 河北医科大学第四医院 肿瘤研究所, 河北石家庄 050011; 2. 石家庄市第一人民医院 肿瘤科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 通过检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中长链非编码 RNA XLOC_002319 (long non-coding RNA XLOC_002319, lncRNA XLOC_002319) 基因的表达及其甲基化状态, 探讨 XLOC_002319 基因在 ESCC 发生及发展中的作用。**方法:** 分别应用 RT-PCR 以及甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)的方法检测 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)处理前后的食管癌细胞株(TE1、TE13、Yes-2、Eca109 和 T. TN)、ESCC 组织以及癌旁正常组织、食管上皮内瘤变(esophageal intraepithelial neoplasia, EIN)组织中 XLOC_002319 基因的表达和甲基化状态。**结果:** 未经 5-aza-dC 处理的 5 种食管癌细胞中 XLOC_002319 基因的表达均呈阴性或弱阳性, 经 5-aza-dC 的 5 种食管癌细胞中 XLOC_002319 基因的表达均增高。5 株食管癌细胞在 5-aza-dC 处理前表现为 XLOC_002319 高甲基化状态, 处理后, Eca109 和 T. TN 细胞系中 XLOC_002319 基因甲基化程度降低, 其余 3 株细胞系中 XLOC_002319 基因均表现为非甲基化状态。XLOC_002319 基因在 ESCC 组织中的表达显著低于食管上皮内瘤变组织和癌旁正常组织($P < 0.01$), 并与组织学分化程度和 TNM 分期密切相关($P < 0.05$)。ESCC 组织中 XLOC_002319 基因启动子区甲基化率为 63.75%(51/80), 显著高于食管上皮内瘤变组织和癌旁正常组织($P < 0.01$), 并与淋巴结转移、组织学分化程度和 TNM 分期密切相关($P < 0.05$)。发生 XLOC_002319 基因甲基化的 ESCC 组织中 XLOC_002319 基因表达显著低于未发生甲基化的 ESCC 组织($P < 0.01$)。**结论:** XLOC_002319 基因在 ESCC 中的低表达可能与 ESCC 的发生密切相关, 且其启动子区甲基化可能是导致其表达沉默的机制之一。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; XLOC_002319 基因; DNA 甲基化; 表达

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0675-07

Expression and methylation status of lncRNA XLOC_002319 in esophageal squamous cell carcinoma

LIANG Jia¹, KUANG Gang¹, LIU Shengnan¹, GUO Wei¹, SHEN Supeng¹, DING Chunyan¹, LI Huijie², DONG Zhiming¹(1. Cancer Institute of Hebei Province, the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Oncology, Shijiazhuang City First People's Hospital, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and methylation status of long non-coding RNA XLOC_002319 (lncRNA XLOC_002319) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to elucidate its role in the progression of ESCC. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and methylation specific PCR (MSP) were used respectively to detect the expression and methylation status of XLOC_002319 in esophageal cancer cell lines (TE1, TE13, Yes-2, Eca109, T. TN) treated or untreated with DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), and in cancer-adjacent normal tissues, esophageal intraepithelial neoplasia (EIN) tissues and ESCC tissues. **Results:** Negative or weak positive expression of XLOC_002319 was detected in the five esophageal cancer cell lines untreated with 5-aza-dC; however, after the treatment with 5-aza-dC, the expression of XLOC_002319 was enhanced. The methylation status of XLOC_002319 was highly expressed in esophageal cancer cell lines before the treatment of 5-aza-dc, however, after the treatment, the methylation level was decreased in Eca109 and T. TN cell lines, while the status in other

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81572441); 河北省自然科学基金资助项目(No. H2015206196)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81572441), and the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. H2015206196)

[作者简介] 梁佳(1987-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 主要从事肿瘤发病机制研究, E-mail: liangjia603@163.com

[通信作者] 董稚明(DONG Zhiming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@163.com

three cell lines was negative. The expression of *XLOC_002319* gene in ESCC tissues was significantly reduced compared to cancer-adjacent tissues and EIN tissues ($P < 0.01$), and was closely associated with pathological differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). The methylation frequency of *XLOC_002319* promoter in ESCC tissues (63.75% [51/80]) was significantly higher than that in EIN tissues and adjacent normal tissues ($P < 0.01$), and it was also associated with lymph node metastasis, pathological differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). The expressions of *XLOC_002319* in ESCC tumor tissues with methylation of the gene was significantly lower than that in tumor tissues with unmethylation of the gene ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aberrant low expression of lncRNA *XLOC_002319* was closely related to the development and occurrence of ESCC, and promoter methylation might be one of the mechanisms for inactivation of *XLOC_002319* in ESCC.

[**Key words**] esophageal squamous cell carcinoma; *XLOC_002319* gene; DNA methylation; expression

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 675-681. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.015]

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNA) 是指长度在 200 ~ 100 000 核苷酸 (nucleotide, nt) 之间, 同时不编码蛋白质的 RNA 分子。有研究^[1-2]发现, lncRNA 主要从表观遗传学调控、转录调控、转录后调控 3 种层面实现对基因表达的调控, 同时参与 X 染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要调控过程。近年来大量研究^[3-4]已经证实, lncRNA 在多种人类疾病中发挥着重要作用, 尤其是在恶性肿瘤中。*XLOC_002319* 基因是 Cao 等^[5]利用基因芯片检测食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 组织及癌旁正常组织中 lncRNA 的表达谱的研究中筛选出来的, 在 ESCC 中表达下降达 5 倍以上, 该基因位于人类 2 号染色体上。本研究 ESCC 组织及食管癌细胞株检测癌旁正常组织、食管上皮内瘤变 (esophageal intraepithelial neoplasia, EIN) 中 *XLOC_002319* 基因的表达及甲基化状态, 分析其甲基化状态与表达的相关性, 探讨 *XLOC_002319* 基因在 ESCC 发生及发展中的作用, 以期为寻找 ESCC 临床诊断和治疗的分子靶点提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2012 年 5 月至 2014 年 10 月河北医科大学第四医院生物标本库收集的 80 例 ESCC 手术患者标本, 其中男性 56 例, 女性 24 例, 年龄 37 ~ 74 岁, 中位年龄 61 岁。全部患者术前均未经化疗和放疗, 该研究中所有研究对象均签署知情同意书, 并经医院伦理委员会批准同意。每例患者均取食管癌原发灶组织、距癌组织边缘 2 ~ 5 cm 处的癌旁组织及距癌组织边缘大于 5 cm 处的癌旁正常组织, 每例采集的标本一部分于液氮保存用于 DNA 和 RNA 的提

取, 另一部分标本用 10% 中性甲醛溶液固定, 常规制作蜡块切片行 H-E 染色后进行组织形态学鉴定。按照国际抗癌联盟 (UICC) 标准进行 TNM 分期: I 期 3 例, II 期 65 例, III 期 10 例, IV 期 2 例。按照 WHO 肿瘤病理学分级标准: 高中分化患者 34 例, 低分化 46 例。同时在 80 例癌旁组织中选取经 H-E 染色病理形态为食管上皮内瘤变 29 例, 其中低级别上皮内瘤变 10 例, 高级别上皮内瘤变 19 例。

1.2 细胞株和主要试剂

实验用食管癌细胞株 TE1、TE13、Yes-2、Eca109、T. TN 由本院生物标本库保留并传代。蛋白酶 K 购自 Merck 公司, 亚硫酸氢钠、氢醌和 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 均购自 Sigma 公司, TRIzol 购自 Invitrogen 公司。甲基化酶购自 NEB 公司。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司。Wizard DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司, 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。所有引物均由北京赛百盛公司合成。

1.3 食管癌细胞的培养

TE1、TE13、Yes-2、Eca109、T. TN 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI1640 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度和 CO_2 体积分数 5% 的培养箱中传代培养。取对数生长期细胞, 用 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 5-aza-dC 处理细胞株作为实验组, 每 24 h 更换液体, 培养 2 d, 第 3 天换全血清培养基培养 24 h 后收集细胞并提取 DNA 及 RNA。用未经 5-aza-dC 处理的细胞作为对照组。

1.4 RT-PCR 法检测食管癌细胞株及 ESCC 组织中 *XLOC_002319* mRNA 表达

按 TRIzol 实际说明书, 提取 5-aza-dC 处理前后的细胞系和 80 例 ESCC 组织、29 例食管上皮内瘤变及 80 例癌旁正常组织中的总 RNA, 并参照逆转录试剂盒说明书的比例加样, 将 RNA 逆转录成 cDNA。以 *GAPDH* 为内参照, 引物序列及退火温度见表 1。

所有 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并用凝胶成像分析软件 Gel Pro Analyzer 3.1 测定条

带灰度值, 以目的基因的灰度值/内参的灰度值, 计算相对表达量, 进行分析。

表 1 RT-PCR 及甲基化特异性 PCR(MSP)的引物序列

Tab. 1 The primer sequences for reverse transcription PCR and methylation-specific PCR(MSP)

Type	Primer sequence	Annealing temperature ($t/^{\circ}\text{C}$)	Product length (bp)
RT-PCR			
<i>XLOC_002319</i>	F: 5'-GGCTTTAGGGAGAGAGGGCT-3'	48	104
	R: 5'-AGCGCCAGGGAATAAGTGAA-3'		
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	56	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'		
MSP			
Methylation	F: 5'-GTTCTTTTTTTTATACGGCGGTTTCG-3'	48	174
	R: 5'-AAAACGAAACCGAACCGAAAACG-3'		
Unmethylation	F: 5'-GTTTCTTTTTTTATATGTGTGTTTG-3'	56	174
	R: 5'-AAAACAAAACCAAACCAAAAACA-3'		

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 MSP 法检测 5-aza-dC 处理前后食管癌细胞株和 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因的甲基化状态

采用常规酚/氯仿抽提法, 提取 5-aza-dC 处理前后食管癌细胞株和 80 例 ESCC 组织、29 例食管上皮内瘤变及 80 例癌旁正常组织中 DNA 后, 用紫外分光光度法进行定量, 每个样本中均取 2 μg DNA, 用 2 mol/L NaOH 变性处理, 于 10 mmol/L 氢醌和 3 mol/L 亚硫酸氢钠中 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 ~ 16 h, 处理后的 DNA 用 Wizard DNA 纯化试剂进行纯化。经亚硫酸氢盐处理后, DNA 中的 C 转变为 U, 而基因的 CpG 岛发生甲基化后, 则不能发生这种改变, 根据此原理设计相应的引物, 检测该基因是否发生甲基化。

经加州大学圣克鲁兹分校(University of Califor-

nia Santa Cruz, UCSC)基因序列数据库进行序列检索, 并运用在线软件 Meth Primer 预测 *XLOC_002319* 基因启动子区的 CpG 岛情况, *XLOC_002319* 基因有 3 个 CpG 岛存在, 分别位于 -842 ~ -695、-339 ~ -103 和 -88 ~ 40, 进而选取 *XLOC_002319* 基因启动子区富含 CpG 岛的岛 2 和岛 3 部位进行分析并进行引物设计(图 1)。用甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增, 引物序列、退火温度及产物大小见表 1。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min 后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。MSP 扩增产物经 2% 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。

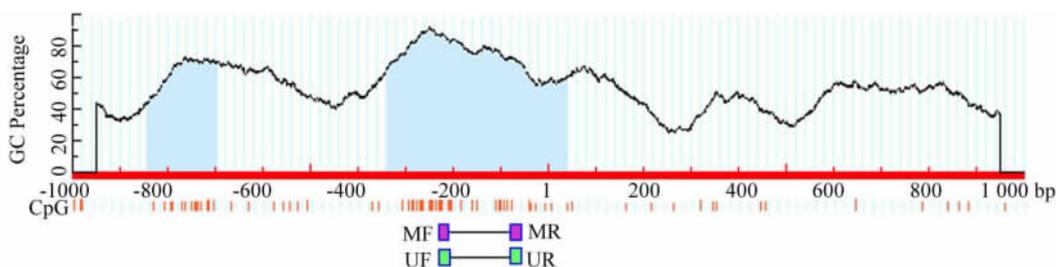


图 1 Meth primer 预测 *XLOC_002319* 基因中 CpG 岛的分布

Fig. 1 Prediction of CpG island distribution in lncRNA of *XLOC_002319* by Meth primer

CpG island region: -842 ~ -695, -339 ~ -103 and -88 ~ 40;

Long string: Locus of CpG; MF: Methylated primer; UF: Unmethylated primer

甲基化结果的判定方法如下:(1)完全甲基化:甲基化特异引物扩增出目的条带,而非甲基化特异引物未扩增出目的条带;(2)非甲基化:非甲基化特异引物扩增出目的条带,而甲基化引物未扩增出目的条带;(3)不完全甲基化:甲基化特异引物和非甲基化特异引物均扩增出目的条带,将不完全甲基化归入甲基化。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶 SssI 处理以后进行 PCR,阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制随机选取 10% 的标本进行重复实验。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行数据统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验和校正 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,均为双侧检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

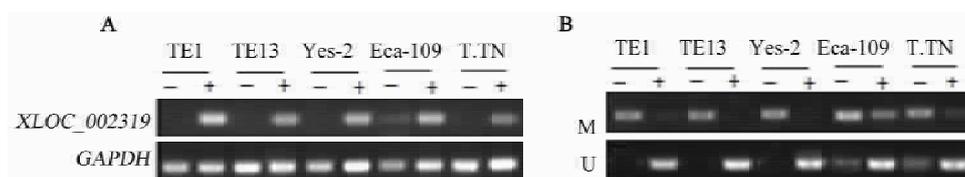


图2 5-aza-dC 处理前后 5 种食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因的表达 (A) 以及其甲基化状态 (B)

Fig. 2 The expression level (A) and the methylation status (B) of *XLOC_002319* gene in five esophageal cancer cell lines treated or untreated with 5-aza-dC

M: Methylated primer; U: Unmethylated primer; -: Untreated with 5-aza-dC; +: Treated with 5-aza-dC

2.3 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因表达及其与临床病理资料的关系

RT-PCR 检测结果(表 2)显示,在癌旁正常组织、低级别 EIN、高级别 EIN 及 ESCC 中 *XLOC_002319* 基因的表达量分别为(0.71 ± 0.07)、(0.65 ± 0.08)、(0.62 ± 0.06)、(0.58 ± 0.14), ESCC 中 *XLOC_002319* 基因的表达量显著低于 EIN($t = -2.841, P < 0.01$)及癌旁正常组织($t = -7.695, P < 0.01$)。EIN 组织亦显著低于癌旁正常食管组织($t = 5.143, P < 0.01$),低级别与高级别 EIN 组织间表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

分析 80 例 ESCC 患者的临床病理资料发现,有淋巴结转移组 ESCC 患者组织中 *XLOC_002319* 基因的表达显著低于无淋巴结转移组[(0.55 ± 0.13) vs (0.60 ± 0.14), $P < 0.05$]。低分化组 ESCC 患者癌组织中 *XLOC_002319* 基因的表达显著低于中高分化组[(0.53 ± 0.13) vs (0.63 ± 0.13), $P < 0.05$]。

2.1 5-aza-dC 处理后食管癌细胞株 *XLOC_002319* 基因高表达

RT-PCR 检测结果(图 2A)显示,未经 5-aza-dC 处理的 5 株食管癌 TE1、TE13、Yes-2、Eca109、T. TN 细胞中 *XLOC_002319* 基因表达均呈阴性或弱阳性;经 5-aza-dC 处理后,5 种食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因的表达均增高。

2.2 5-aza-dC 处理后食管癌细胞株 *XLOC_002319* 基因甲基化状态

MSP 检测结果(图 2B)显示,未经 5-aza-dC 处理的 5 株食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因均扩增出甲基化条带;用 5-aza-dC 处理后,Eca109 和 T. TN 细胞中 *XLOC_002319* 基因甲基化程度降低,其余 3 株细胞中 *XLOC_002319* 基因均表现为非甲基化状态。

III-IV 期 ESCC 患者癌组织中 *XLOC_002319* 基因的表达显著低于 I-II 期患者[(0.43 ± 0.05) vs (0.60 ± 0.13), $P < 0.05$],按照年龄、性别分组进行统计分析,各组 ESCC 中 *XLOC_002319* 基因的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因甲基化状态与临床病理特征的关系

在癌旁正常组织、低级别 EIN、高级别 EIN 及 ESCC 中 *XLOC_002319* 基因的甲基化率分别为 11.25% (9/80)、30.00% (3/10)、36.84% (7/19)、63.75% (51/80),结果显示该基因在 ESCC 组织中甲基化率显著高于 EIN 组织($\chi^2 = 7.398, P < 0.01$)及癌旁正常组织($\chi^2 = 7.726, P < 0.01$)。EIN 组织亦显著高于癌旁正常组织($\chi^2 = 7.982, P = 0.005$),低级别与高级别 EIN 组织间甲基化率差异无统计学意义($P < 0.05$)。*XLOC_002319* 基因甲基化状态与患者的淋巴结转移($\chi^2 = 8.405, P < 0.01$)、组织

学分化程度($\chi^2 = 25.223, P < 0.01$)及 TNM 分期($\chi^2 = 4.761, P < 0.05$)有关,而与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$),(表 2)。

2.5 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因表达与其甲基化的关系

在 80 例 ESCC 组织中,*XLOC_002319* 基因的启动子区甲基化率为 63.75% (51/80),发生 *XLOC_002319* 基因甲基化的组织中其表达水平显著低于未发生甲基化的组织(图 3,表 3)。

表 2 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因的表达水平及甲基化状态与患者临床病理特征的关系
 Tab.2 The relationships between the expression level and methylation status of *XLOC_002319* gene in ESCC tissues and the clinicopathologic features of ESCC patients

Group	N	Expression of <i>XLOC_002319</i>			Methylation of promoter		
		$\bar{x} \pm s$	t	P	n(%)	χ^2	P
Total	80	0.58 ± 0.14	-7.695	0.000	51(63.75)	7.426	0.006
Gender							
Male	56	0.57 ± 0.14			35(43.75)		
Female	24	0.59 ± 0.14	-0.591	0.992	16(20.00)	0.126	0.722
Age(t/a)							
<61	37	0.58 ± 0.13			26(52.00)		
≥61	43	0.57 ± 0.15	0.423	0.166	25(31.25)	1.266	0.260
Lymph node							
Positive	38	0.60 ± 0.14			33(41.25)		
Negative	42	0.55 ± 0.13	1.619	0.545	18(22.50)	8.405	0.004
Histological grade							
Well	34	0.63 ± 0.13			11(13.75)		
Poorly	46	0.53 ± 0.13	-3.273	0.002	40(50.00)	25.223	0.000
TNM stage							
I + II	68	0.60 ± 0.13			40(50.00)		
III + IV	12	0.43 ± 0.05	7.993	0.000	11(13.75)	6.675	0.029

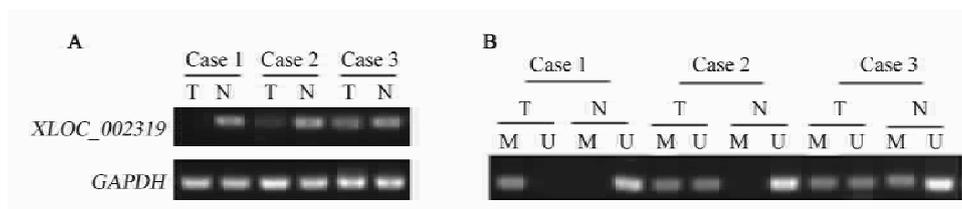


图 3 ESCC 及癌旁正常组织中 *XLOC_002319* 基因的表达(A)及其甲基化状态(B)
 Fig. 3 The expression levels (A) and the methylation status (B) of *XLOC_002319* gene in ESCC tissues and cancer-adjacent normal tissues

T: Tumor tissues; N: Cancer-adjacent normal tissues; M: Methylated primer; U: Unmethylated primer

表3 *XLOC_002319* 基因在不同食管病变中的表达及甲基化状态

Tab. 3 The expression level and methylation status of *XLOC_002319* gene in various esophageal tissues

Group	N	Expression of <i>XLOC_002319</i> ($\bar{x} \pm s$)	Methylation of promoter [n(%)]
Normal tissues	80	0.71 ± 0.07	9(11.25)
EIN	29	0.63 ± 0.07	10(34.48)
Low-grade	10	0.65 ± 0.08	3(30.00)
High-grade	19	0.62 ± 0.06	7(36.84)
ESCC tissues	80	0.58 ± 0.14	51(63.75)

3 讨论

食管癌在全球恶性肿瘤死亡率中排名第六,其主要病理类型为 ESCC,食管上皮内瘤变是 ESCC 的癌前病变,食管上皮内瘤变演变成癌是 ESCC 发生的重要途径。由于食管癌发病症状较隐匿,大多数患者就诊时已为中、晚期,导致食管癌预后差,5 年生存率低于 30%^[6]。过去对食管癌的研究多集中在编码基因方面,然而越来越多的证据表明 lncRNA 在多种人类疾病的发生中发挥着重要作用,尤其是在人类恶性肿瘤中^[7]。随着高通量测序和 lncRNA 芯片检测的大规模应用,有研究^[8]发现,在恶性肿瘤中有很多异常表达的 lncRNAs,提示 lncRNAs 确实参与细胞的分化及恶性转化,从而作为潜在的肿瘤抑制基因或癌基因,导致肿瘤的发生^[9],因此 lncRNA 将有望在食管癌早期诊断、临床治疗和预后评估研究中成为新的生物标志物。

目前,lncRNA 在食管癌中的研究还处于起步阶段,发现的肿瘤特异性 lncRNA 还非常少。*H19* 是第一个被发现的非编码 RNA 基因,具有癌基因和抑癌基因的双重功能。有研究发现 *H19* 基因在食管癌中表达上调^[10]。Ge 等^[11]研究发现,*HOTAIR* 在 ESCC 中的表达显著高于癌旁正常组织,*HOTAIR* 高表达的患者预后明显较差,同时发现 *HOTAIR* 表达升高促进组蛋白 H3K27 甲基化降低 *WIF-1* 表达,进而激活 Wnt 信号通路。Cao 等^[5]利用转录组芯片检测 ESCC 组织及癌旁正常组织中 lncRNA 的表达谱,从中筛选出 lncRNA *XLOC_002319* 基因,其在 ESCC 组织中表达下降 5 倍以上。本研究检测了 5 种食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因的表达,结果显示在未经任何处理的食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基

因的表达均呈阴性或弱阳性;同时在相对大的样本范围内检测了 ESCC 组织中 *XLOC_002319* 基因的表达,发现其在 ESCC 组织中的表达显著低于食管上皮内瘤变及癌旁正常组织,提示 *XLOC_002319* 基因在 ESCC 中可能主要起抑癌基因的作用,并且通过临床病例分析,发现 *XLOC_002319* 基因表达与 ESCC 的病理分级和患者的 TNM 分期有关。这与 Cao 等^[5]的研究结果相一致。

Beckedorff 等^[12]指出,lncRNA 涉及几乎所有的表观遗传调控事件,表观遗传机制的失调可能引起各种基因的激活或抑制,并可能导致癌症。与其他非编码 RNA(如 miRNA、piRNA)一样,lncRNA 不仅可以通过表观遗传方式调控其他基因的表达,其本身的表达也受到表观遗传的调控。DNA 甲基化造成的启动子区高甲基化是基因失活或低表达的原因之一。有研究^[13]发现,乳腺癌中 *LINC00472* 基因的表达是由启动子区甲基化所调控的,并与 2 级乳腺癌的患者的生存率有关。DNA 甲基化可能是 lncRNA *MEG3* 在神经胶质瘤、急性骨髓性白血病中表达降低主要机制之一^[14-15]。因此,本研究进一步分析了导致 *XLOC_002319* 基因在 ESCC 中表达降低的表观遗传学机制。应用 MSP 法检测 5 种食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因的甲基化状态,结果显示未经 5-aza-dC 处理的 5 种食管癌细胞株中 *XLOC_002319* 基因均扩增出甲基化条带,应用 5-aza-dC 处理后,Eca109 和 T. TN 细胞株中 *XLOC_002319* 甲基化程度降低,非甲基化程度增加,其余 3 种细胞株中 *XLOC_002319* 基因均表现为非甲基化状态,提示 lncRNA *XLOC_002319* 基因在食管癌中表达缺失或降低可能与其 DNA 甲基化有关。本研究还发现,*XLOC_002319* 基因在 ESCC 组织中的甲基化率显著高于食管上皮内瘤变及癌旁正常组织,进一步提示 *XLOC_002319* 基因表达下调可能与其启动子区 CpG 岛异常高甲基化密切相关。并且 *XLOC_002319* 基因的高甲基化与食管癌组织的淋巴结转移、病理分级及患者 TNM 分期相关,提示该基因甲基化导致的基因沉默可能与食管癌的恶性表型相关,对预后评估可能有一定的参考价值,值得深入研究。

本研究中,Eca109 和 T. TN 细胞系中 *XLOC_002319* 基因的甲基化状态没有完全逆转,分析其原因可能是:(1)由于在不同的细胞系中 *XLOC_002319* 基因发生甲基化的 CpG 位点可能不同,同一 CpG 位点在不同的细胞系中甲基化率可能不同;(2)可能是由于药物剂量太低或药物作用时间短,

不足以完全逆转甲基化从而导致的不完全甲基化状态;(3)可能存在其他机制共同作用于该基因,使其表达下调,如组蛋白乙酰化及染色质重塑等其他表遗传学机制导致的 *XLOC_002319* 基因表达下降。

总之,本项研究显示,*XLOC_002319* 基因在 ESCC 组织中的表达显著低于食管上皮内瘤变及癌旁正常组织,且其启动子区甲基化可能是导致该基因在 ESCC 组织中表达下降的主要机制之一。最新研究^[16-17]表明,多种 lncRNA 在食管癌的发病过程中发挥着重要作用,有望在食管癌的早期诊断及预后评估中成为新的分子标志物。对 *XLOC_002319* 基因作用机制的进一步深入研究,有望为食管癌的早期诊断提供有价值的分子靶点。

[参 考 文 献]

- [1] KIM E D, SUNG S. Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks [J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(1): 16-21. DOI: 10. 1016/j. tplants. 2011. 10. 008.
- [2] ROBERTS T C, MORRIS K V, WEINBERG M S. Perspectives on the mechanism of transcriptional regulation by long non-coding RNAs [J]. Epigenetics, 2014, 9(1): 13-20. DOI: 10. 4161/epi. 26700.
- [3] QI P, DU X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine [J]. Mod Pathol, 2013, 26(2): 155-165. DOI: 10. 1038/modpathol. 2012. 160.
- [4] FANG Y, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016, 14(1): 42-54. DOI: 10. 1016/j. gpb. 2015. 09. 006.
- [5] CAO W, WU W, SHI F, et al. Integrated analysis of long non-coding RNA and coding RNA expression in esophageal squamous cell carcinoma [J/OL]. Int J Genomics, 2013, 2013: 480534 [2016-07-14]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3814080/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3814080/). DOI: 10. 1155/2013/480534.
- [6] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90. DOI: 10. 3322/caac. 20107.
- [7] TAHIRA A C, KUBRUSLY M S, FARIA M F, et al. Long non-coding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer [J/OL]. Mol Cancer, 2011, 10: 141 [2016-07-14]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3225313/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225313/). DOI: 10. 1186/1476-4598-10-141.
- [8] BRUNNER A L, BECK A H, EDRIS B, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers [J]. Genome Biol, 2012, 13(8): R75. DOI: 10. 1186/gb-2012-13-8-r75.
- [9] GUTSCHNER T, DIEDERICH S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view [J]. RNA Biol, 2012, 9(6): 703-719. DOI: 10. 4161/rna. 20481.
- [10] GAO T, HE B, PAN Y, et al. H19 DMR methylation correlates to the progression of esophageal squamous cell carcinoma through IGF2 imprinting pathway [J]. Clin Transl Oncol, 2014, 16(4): 410-417. DOI: 10. 1007/s12094-013-1098-x.
- [11] GE X S, MA H J, ZHENG X H, et al. HOTAIR, a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma, inhibits WIF-1 expression and activates Wnt pathway [J]. Cancer Sci, 2013, 104(12): 1675-1682. DOI: 10. 1111/cas. 12296.
- [12] BECKEDORFF F C, AMARAL M S, DEOCESANO-PEREIRA C, et al. Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics [J/OL]. Biosci Rep, 2013, 33(4). pii: e00061 [2016-07-14]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3759304/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759304/). DOI: 10. 1042/BSR20130054.
- [13] SHEN Y, WANG Z, LOO L W, et al. LINC00472 expression is regulated by promoter methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 154(3): 473-482. DOI: 10. 1007/s10549-015-3632-8.
- [14] WANG P, REN Z, SUN P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 1868-1874. DOI: 10. 1002/jcb. 24055.
- [15] 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. DOI: 10. 1016/j. leukres. 2009. 06. 019.
- [16] SHAFIEE M, ALEYASIN S A, VASEI M, et al. Down-regulatory effects of miR-211 on long non-coding RNA SOX2OT and SOX2 genes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell J, 2016, 17(4): 593-600 [2016-07-14]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC4746409/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746409/). PMID: PMC4746409.
- [17] HUANG M D, CHEN W M, QI F Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of KLF2 [J/OL]. Mol Cancer, 2015, 14: 165 [2016-07-14]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC4558931/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558931/). DOI: 10. 1186/s12943-015-0431-0.

[收稿日期] 2016 - 05 - 25

[修回日期] 2016 - 08 - 25

[本文编辑] 党瑞山