

长链非编码 RNA MEG3 对胃癌细胞增殖的影响

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

(¹南京医科大学第一临床医学院, ²生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA MEG3 在胃癌组织及细胞系中的表达水平,以及过表达 MEG3 对胃癌细胞增殖能力的影响,并探索其可能的作用机制。方法:用定量反转录 PCR(qRT-PCR)技术检测胃癌组织及细胞系中 MEG3 的表达水平;通过转染 pcDNA-MEG3 上调 MEG3 的表达水平,并通过 qRT-PCR 检测转染效率。用 MTT 和克隆形成试验检测上调 MEG3 的水平对 BGC-823 细胞和 MGC-803 细胞的增殖能力的影响,Western blot 检测这两种细胞中上调 MEG3 的水平对 p53 蛋白的表达水平的影响。结果:相比正常胃组织及细胞,在胃癌组织和细胞中 MEG3 的表达出现显著下调,SGC7901、MGC-803 和 BGC-823 细胞中 MEG3 的表达水平分别是正常胃上皮细胞 GES-1 中的 73.6%、42.0%和 27.1% ($P < 0.05$)。BGC-823 细胞和 MGC-803 细胞中转染 pcDNA-MEG3 能显著上调 MEG3 的表达,MEG3 的表达水平分别为对照组的 252 倍和 311 倍 ($P < 0.05$);MTT 和克隆形成试验显示,上调 MEG3 的表达能降低 BGC-823 细胞和 MGC-803 细胞的增殖能力。Western blot 实验显示,转染了 pcDNA-MEG3 的 MGC-803 和 BGC-823 细胞中 p53 的表达相较于对照组中显著增加。结论:胃癌组织及细胞中 MEG3 的表达下调,且这可能通过抑制 p53 蛋白的激活从而促进胃癌细胞增殖,影响胃癌的发生和发展。

[关键词] 胃癌;长链非编码 RNA;MEG3;细胞增殖;p53

[中图分类号] Q253

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-001-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140101

Down-regulation of long noncoding RNA MEG3 promotes cell proliferation in gastric cancer

Sun Qian¹, Liu Boxun¹, Lin Mengjie¹, Yin Lingdi¹, Chen Zhiqiang¹, Sun Ming², De Wei², Liu Zhijun^{2*}

(¹First School of Clinical Medicine, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of long noncoding RNA MEG3 in gastric cancer tissues and cell lines, and to study the effect of up-regulation of MEG3 expression on gastric cancer cells proliferation and its possible mechanisms. **Methods:** Quantitative reverse-transcription PCR was performed to detect the relative expression of MEG3 in gastric cancer cell lines and tissues. pcDNA-MEG3 was transfected into BGC-823 cells and MGC-803 cells to down-regulate MEG3 expression, and quantitative reverse-transcription PCR was used to test the transfection efficiency. MTT and colony formation assays were performed to detect the effect of MEG3 on gastric cancer cells proliferation. Western blot assay was used to test the expression level of p53 protein in MGC-803 cells and BGC-823 cells transfected with pcDNA-MEG3, respectively. **Results:** This study showed that MEG3 was lowly expressed both in gastric cancer samples and cell lines compared with their corresponding normal tissues and cell lines. The expression level of MEG3 in SGC7901, MGC-803 and BGC-823 cells were 73.6%, 42.0% and 27.1% of that in normal gastric epithelium cell GES-1, respectively ($P < 0.05$). Transfection of pcDNA-MEG3 significantly increased its expression in BGC-823 cells and MGC-803 cells, respectively, 252 and 311 folds compared with control cells ($P < 0.05$). MTT and colony formation assays indicated that up-regulated MEG3 inhibited BGC-823 and MGC-803 cells proliferation. Western blot assay showed that the expression level of p53 protein was significantly increased in MGC-803 cells and BGC-823 cells transfected with pcDNA-MEG3, compared with the control group, respectively. **Conclusion:** Down-regulated MEG3 could promote gastric cells proliferation, probably by inhibiting the activation of p53 protein, and thus affect the development and progression of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; long noncoding RNA; MEG3; cell proliferation; p53

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):001-006]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81070620)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuzhijun100200@126.com

胃癌是导致全球癌症相关死亡的第 2 大恶性肿瘤,近年来其发病率呈上升趋势,每年约有 100 万新发病例,其中 50% 的病例发生在东亚地区(主要在中国)^[1]。胃癌早期临床症状不典型,确诊的患者多以进展期胃癌为主,常伴有淋巴结转移和腹腔内侵袭、转移,因此胃癌患者治疗效果不佳、预后差,5 年生存率低于 10%^[2]。因此,更好地理解胃癌的发病机制以及分子水平的变化对发展生物诊断标志物至关重要,这些标志物能帮助提供新的有效的胃癌治疗手段。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类在基因组转录中不参与编码蛋白、长度超过 200 nt 的转录产物。它具备多种生物学功能,并在染色质修饰、转录、翻译、剪接、表观遗传学调控等^[3]多种生物进程中发挥重要作用。研究证实, lncRNA 的变异和调节异常能够导致包括肿瘤在内的多种疾病^[4]。因此确定癌症相关的 lncRNA 并研究其分子和生物学功能对理解肿瘤分子生物学及其进展十分重要。

母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 是位于染色体 14q32 的肿瘤抑制基因,其编码产物——非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 与肿瘤发生有关^[5]。MEG3 RNA 在许多正常组织中表达,但在许多人类原发性肿瘤中表达缺失,包括神经胶质瘤、肝细胞肝癌、脑膜瘤和膀胱癌^[6-9]。在人神经胶质瘤细胞系中,MEG3 过表达能够诱导细胞生长停滞并促进细胞凋亡^[6]。但是,目前对 MEG3 在胃癌中的表达水平和在胃癌致病机制中的生物学作用知之甚少。

本研究旨在阐明 lncRNA MEG3 在胃癌中的表达情况,探索 MEG3 水平变化对体外胃癌细胞表型的影响,进一步希望为胃癌预后提供的新标志物,为胃癌干预治疗提供新的靶标。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织收集

36 例样本来自于南京医科大学第一附属医院 2006~2008 年被诊断为胃癌并接受手术的患者,这些样本经过病理科严格鉴定(分期 II、III、IV;美国癌症联合会癌症分期指南第 7 版)。在手术前所有患者均未接受过局部或全身治疗。所有样本取下后立即液氮冷冻,在提取 RNA 之前,一直置于 -80°C 环境中冻存。本研究经南京医科大学伦理委员会批准,

并取得所有患者的知情同意书。

1.1.2 细胞系和培养条件

3 种胃癌细胞系 (SGC7901、MGC-803 和 BGC-823) 以及胃黏膜上皮正常细胞系 GES-1 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。细胞用高糖 DMEM、含有 10% FBS、100 U/ml 青霉素以及 100 mg/ml 链霉素的培养基于 37°C, 含 5% CO₂ 的潮湿恒温培养箱中常规培养。每 1~2 d 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 方法

1.2.1 RNA 提取和定量反转录 PCR (qRT-PCR)

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国) 提取组织或培养的细胞中的总 RNA。使用反转录盒 (TaKaRa 公司, 大连) 将 RNA 反转录为 cDNA。使用 Power SYBR Green (TaKaRa 公司, 大连) 做实时 PCR 分析。结果用 GAPDH 的表达量标准化。MEG3 的 PCR 引物: 上游引物: 5'-CTGCCCATCTACACCTCACG-3', 下游引物: 5'-CTCTCCGCCGTCTGCGCTAGGGGCT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GTCAACGGATTTGGTCTGTATT-3', 下游引物: 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'。qRT-PCR 和数据收集基于 ABI 7500 平台。MEG3 相对于 GAPDH 的表达使用 2^{-ΔΔCt} 法计算和标准化。

1.2.2 质粒的构建

MEG3 序列被合成和亚克隆至 pcDNA3.1 载体 (Invitrogen 公司, 上海)。通过使用 pcDNA-MEG3 转染实现 MEG3 的异常表达, 使用空的 pcDNA 载体作为对照。使用 qPCR 检测 MEG3 的表达水平。

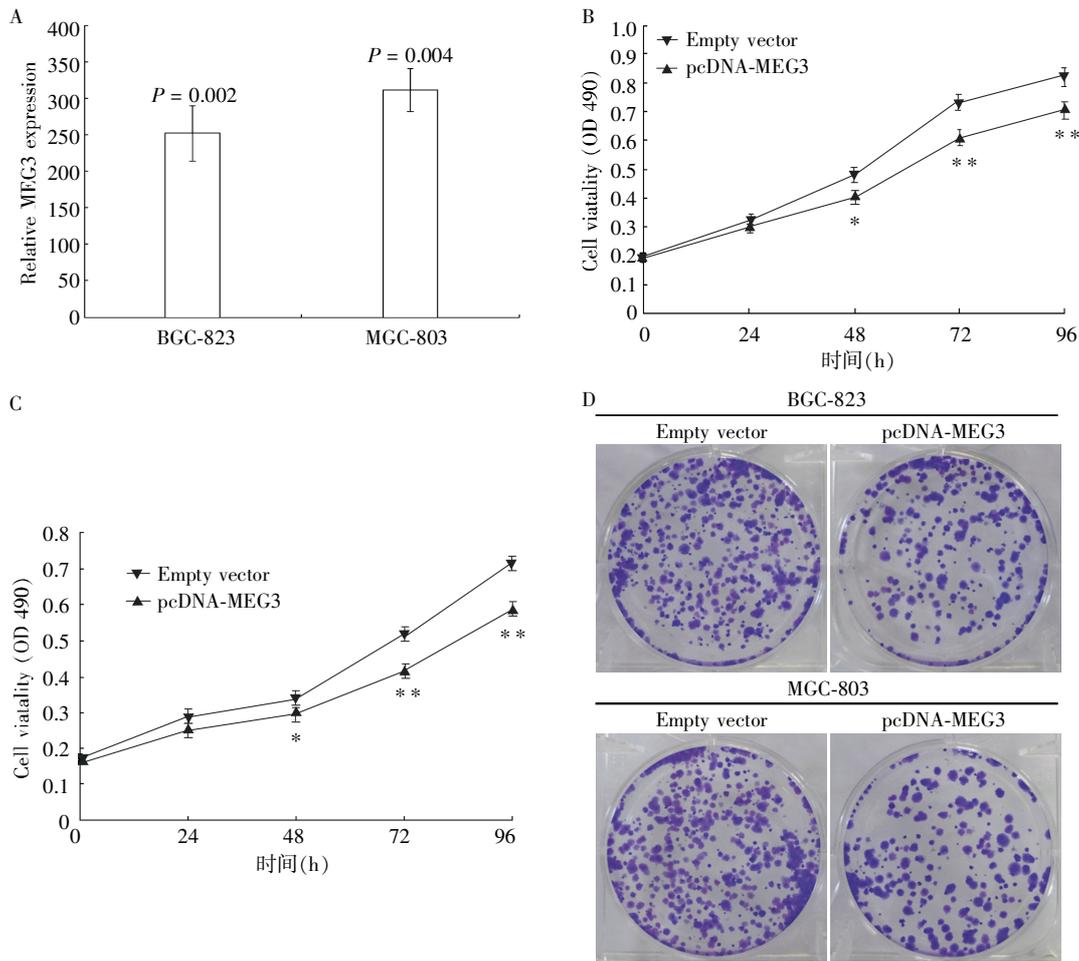
1.2.3 质粒转染

所有用于转染的质粒载体 (pcDNA-MEG3 和空载体) 经 Midiprep 盒 (QIAGEN 公司, 德国) 提取。按照使用说明通过 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 上海) 将 pcDNA-MEG3 或空载体转染至 6 孔平板上培养的细胞。48 h 后收集细胞用于 qRT-PCR 和 Western blot 分析。

1.2.4 细胞增殖试验

本研究使用 MTT 试剂盒 (Sigma 公司, 美国) 并按其使用说明进行细胞增殖试验。对于克隆形成试验, 在含有 10% FBS 的 6 孔板中, 每孔加入 500 个细胞, 保存 2 周。集落用甲醇固定并用 0.1% 的结晶紫在 PBS 中染色 15 min。通过用倒置显微镜取 3 个随机视野观察来判断集落形成情况。每个处理组 3 个复孔。

1.2.5 Western blot



A: 转染了 pcDNA-MEG3 的 BGC-823 和 MGC-803 细胞中 MEG3 的过表达效率。纵轴过表达效率数值为与各自空白对照对比的相对值; B: MTT 实验显示与转染了空载体的细胞相比, 转染了 pcDNA-MEG3 的 BGC-823 细胞生长情况明显受抑 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); C: MTT 实验显示与转染了空载体的细胞相比, 转染了 pcDNA-MEG3 的 MGC-803 细胞生长情况明显受抑 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); D: 克隆形成实验显示与转染了空载体的细胞相比, 转染了 pcDNA-MEG3 的克隆源性 BGC-823 细胞和 MGC-803 细胞存活明显减少。

图 2 上调 MEG3 的表达对 BGC-823 和 MGC-803 细胞增殖的影响

Figure 2 The effect of up-regulated MEG3 on BGC-823 cells and MGC-803 cells proliferation

pcDNA-MEG3 的 MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞的 p53 表达水平明显增高至各自对照组细胞的 2.3 倍 ($P = 0.026$) 与 2.2 倍 ($P = 0.031$, 图 3B)。这些数据提示, MEG3 在胃癌中可能通过激活 p53 的表达而发挥抑制肿瘤生长的作用。

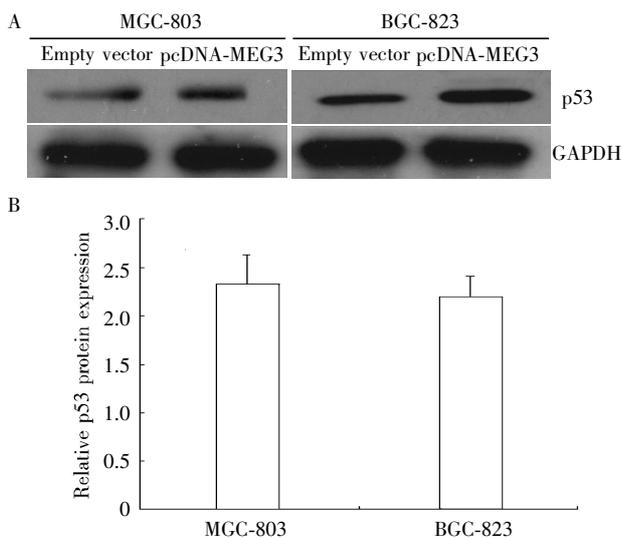
3 讨论

胃癌是异质的、多因素的侵袭性疾病, 是癌症相关死亡的主要原因, 也是全世界范围的重大公共卫生问题。胃癌预后较差, 难以治愈, 患者的预后取决于确诊时癌症的分期, 完全切除癌组织依旧是目前得到证实的唯一治愈措施。

在细胞水平上, 胃癌早期和远期进展中发生的一系列复杂的分子异常将扰乱正常的细胞功能。这些异常包括遗传和表观遗传学修饰, 导致许多基因

在正常和受影响的细胞中差异表达。因此, 针对这些分子的异常改变进行研究, 理解癌细胞生物学行为的机制对于更深入地认识胃癌很重要。其中, 随着对长链非编码 RNA 探索的逐渐深入, 长链非编码 RNA 的异常表达对胃癌的发生发展的机制也逐渐为人们所了解。

Yang 等^[11]实验证明, lncRNA H19 在胃癌细胞和组织中的表达显著增高, H19 的高表达促进了细胞增殖, 而 H19 表达抑制可促进胃癌细胞凋亡。他们进一步证实, H19 可以促使 p53 部分失活。有研究发现, 结肠癌中 lncRNA H19 被癌基因转录因子 c-Myc 直接激活, 从而提示 lncRNA H19 可能是 c-Myc 和下游基因表达的中介^[12]。c-Myc 作为转录因子被描述在超过 40% 的胃癌中过表达^[13]。c-Myc 通常被认为是细胞周期、增殖、分化和凋亡的重要调节因子^[14],



A:电泳条带显示转染了 pcDNA-MEG3 的 MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞的 p53 的表达水平高于转染了空载体对照细胞;B:定量放射密度测定法显示转染了 pcDNA-MEG3 的 MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞的 p53 的表达水平显著高于转染了空载体对照细胞。

图 3 Western blot 检测转染了 pcDNA-MEG3 的 MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞与转染了空载体对照细胞的 p53 的表达水平

Figure 3 The expression level of p53 in MGC-803 cells and BGC-823 cells transfected with pcDNA-MEG3 respectively, compared to those with empty vector

其可通过结合到顺式调控元件 E 盒结构以调节靶基因的作用^[15]。随后, Yang 等^[16]再次通过实验证明, lncRNA CCAT1 的过表达也可以促进胃癌细胞的增殖和转移。他们发现, c-Myc 可以直接结合到 CCAT1 启动子区的一个 E 盒结构而调节启动子活性和 CCAT1 的表达。最近, Sun 等^[17]证明 GACAT1 (gastric cancer-associated transcript 1, 或名 AC096655.1-002) 在胃癌中表达降低, 这与胃癌淋巴结转移和远处转移显著相关。另外, GACAT1 在胃癌中的表达水平也因肿瘤分期、侵袭深度和分化程度而不同。

lncRNA MEG3 由位于 14q32 的 MEG3 基因表达, 在体内的生理作用较多。研究表明, lncRNA MEG3 不仅能确保机体按照合适的速率和方向生长发育^[18], 而且也是一种肿瘤抑制因子。有实验证明, MEG3 在垂体瘤中表达被沉默, 而 MEG3 的过量表达则可抑制人体肿瘤细胞的生长, 提示 MEG3 是一个新的重要抑癌基因^[19]。

在一项对脑膜瘤的研究中发现, 脑膜瘤细胞的 MEG3 拷贝数明显降低, MEG3 拷贝数降低的细胞 lncRNA MEG3 的表达水平降低, 而激活 MEG3 的转录则可显著刺激 p53 的表达、抑制肿瘤细胞生长^[20],

一项针对散发性垂体腺瘤的实验同样印证了这一结论^[21]。这两项实验初次证明了 lncRNA MEG3 对 p53 表达调控的作用。另外, lncRNA MEG3 也能增加 GDF15 (TGF- β 家族成员) 的表达, 这成为了 p53 之外的另一抑制细胞增殖的通路^[10]。还有研究表明, 敲除 MEG3 引发 lncRNA MEG3 的缺失也可反过来增强脑血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路的表达^[22]。

可以认定, lncRNA MEG3 一方面可能抑制 VEGF 信号通路, 阻碍肿瘤的血管新生, 从而起到抑癌作用; 一方面可以通过增加 GDF15、p53 等的表达或其他途径抑制肿瘤细胞增殖。

因此, 本研究通过检测长链非编码 RNA MEG3 在胃癌组织及细胞系中的表达水平, 以及过表达 MEG3 对胃癌细胞增殖能力的影响, 来确立 MEG3 与胃癌发生发展的关系, 并由前人实验验证的 MEG3 抑制其他肿瘤细胞增殖的机制推测其可能的在胃癌发生发展中的作用机制。本研究证明, 提高 MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞中 MEG3 的表达可以促进 p53 蛋白的表达, 故提示 lncRNA MEG3 在胃癌发生发展中可能通过促进 p53 的激活而发挥抑癌作用。但是, MEG3 对胃癌细胞增殖的影响可能不仅仅限于 p53 这一条通路, 本研究并未对 GDF15 与 VEGF 通路等其他可能的通路进行更深入的探究。

当前的研究热点, 首先依然是关于 lncRNA MEG3 可能的其他表达调控机制^[20], 即 lncRNA MEG3 还能通过哪些其他作用途径调控肿瘤细胞生长; 其次, lncRNA MEG3 对已有通路具体产生哪些影响, 例如 lncRNA MEG3 是通过哪一层面影响了 p53 的表达; 另外, 肿瘤的发展过程中, MEG3 受到哪些方面调控也是可以研究的方面。例如, 在一项针对肿瘤发生的研究发现, MEG3 的表达受到了 cAMP 的正向调控。cAMP 通过激活 CREB 转录因子, 结合至 MEG3 近端启动子的 cAMP 反应元件, 从而促进 MEG3 的表达, 使 lncRNA MEG3 的含量上调。这个启动子的甲基化会阻断这一调控过程, 进而降低细胞内 lncRNA MEG3 的含量^[23]。肿瘤发生过程中, 调控 MEG3 基因或元件的甲基化程度如何, 怎样影响 lncRNA MEG3 的表达, 是否还有其他表观遗传学的改变抑制了 MEG3 的表达, 以及是否有 lncRNA MEG3 的转录后调控 (如碱基修饰) 等, 都是未来需要解决的问题。

[参考文献]

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. Int J

- Cancer, 2010, 127(12):2893-2917
- [2] Biffi R, Botteri E, Cenciarelli S, et al. Impact on survival of the number of lymph nodes removed in patients with node-negative gastric cancer submitted to extended lymph node dissection [J]. *Eur J Surg Oncol (EJSO)*, 2011, 37(4):305-311
- [3] Mitchell Guttman IA, Garber M, French C, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. *Nature*, 2009, 458(7235):223-227
- [4] Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1):38-55
- [5] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(3):R45-R53
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 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
- [9] Balik V, Srovnal J, Sulla I, et al. MEG3: a novel long non-coding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas [J]. *J Neurooncol*, 2013, 112(1):1-8
- [10] 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
- [11] Yang F, Bi J, Xue X, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells [J]. *FEBS J*, 2012, 279(17):3159-3165
- [12] 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
- [13] Zhang L, Hou Y, Ashktorab H, et al. The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 344(1-2):125-135
- [14] Cole MD, Henriksson M. 25 years of the c-Myc oncogene [C]. *Semin Cancer Bio Academic Press*, 2006, 16(4):241
- [15] Solomon DLC, Amati B, Land H. Distinct DNA binding preferences for the c-Myc/Max and Max/Max dimers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(23):5372-5376
- [16] Yang F, Xue X, Bi J, et al. Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(3):437-445
- [17] Sun W, Wu Y, Yu X, et al. Decreased expression of long noncoding RNA AC096655. 1-002 in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Tumor Bio*, 2013, 34(5):2697-2701
- [18] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2010, 465(7295):175-181
- [19] Zhang X, Zhou Y, Mehta K R, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2003, 88(11):5119-5126
- [20] 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
- [21] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, [Epub ahead of print]
- [22] 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
- [23] Zhao J, Zhang X, Zhou Y, et al. Cyclic AMP stimulates MEG3 gene expression in cells through a cAMP-response element (CRE) in the MEG3 proximal promoter region [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(10):1808-1820

[收稿日期] 2013-10-12