

长链非编码 RNA 母系表达基因 3 多态性与胃癌关系的研究



张麒, 艾良, 代佑果

云南省肿瘤医院腹部外科(昆明 650118)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA 母系表达基因 3 (MEG3) 多态性与胃癌的关系。方法 选择 2013 年 3 月至 2017 年 10 月期间于云南省肿瘤医院住院治疗的汉族胃癌患者 172 例(胃癌组)及健康体检汉族个体 224 人(对照组)作为研究对象。采用 TaqMan 探针法对 MEG3 两个标签单核苷酸多态性(rs7158663 和 rs4081134)进行分型,并分析其与胃癌及其临床病理特征的关系。结果 MEG3 rs7158663 以 GG 基因型作为参照,经 χ^2 检验并校正年龄和性别后发现 AG+AA 基因型在胃癌组中的分布频率明显高于对照组[校正 OR=1.71, 95%CI 为 (1.14, 2.56), $P=0.010$];以 G 等位基因作为参照,经 χ^2 检验并校正年龄和性别后发现 A 等位基因在胃癌组中的分布频率明显高于对照组[校正 OR=1.58, 95%CI (1.15, 2.19), $P=0.005$]。rs4081134 多态性的基因型和等位基因在 2 组间比较差异均无统计学意义($P>0.017$)。MEG3 rs7158663 和 rs4081134 两位点多态性与胃癌患者的临床病理特征均无关($P>0.017$)。结论 MEG3 rs7158663 AG+AA 基因型可能是中国汉族人群胃癌的易感基因之一。

【关键词】 长链非编码 RNA; 母系表达基因 3; 单核苷酸多态性; 胃癌

Association between polymorphism of long non-coding RNA maternally expressed gene 3 and risk of gastric cancer

ZHANG Qi, AI Liang, DAI Youguo

Department of Abdominal Surgery, Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, P. R. China

Corresponding author: ZHANG Qi, Email: 576515981@qq.com

【Abstract】 Objective To explore relationship between long non-coding RNA maternally expressed gene 3 (MEG3) polymorphisms and risk of gastric cancer. **Methods** One hundred and seventy-two Han patients with gastric cancer (gastric cancer group) and 224 Han individuals for physical examination (control group) in the Yunnan Cancer Hospital from March 2013 to October 2017 were selected as subjects. The rs7158663 and rs4081134 polymorphisms of the MEG3 were genotyped by using a TaqMan technique. The associations between the 2 polymorphisms and the risk of the gastric cancer and its clinical features were analyzed using the SPSS software. **Results** The frequencies of the AG+AA genotype and the A allele of the MEG3 rs7158663 in the gastric cancer group were significantly higher than those in the control group using the GG genotype and G allele as a reference respectively [adjusted OR=1.71, 95%CI (1.14, 2.56), $P=0.010$; adjusted OR=1.58, 95%CI (1.15, 2.19), $P=0.005$] after the Chi-square test and the adjustment of age and gender. The frequencies of the AG+AA genotype and the A allele of the MEG3 rs4081134 had no significant differences between the gastric cancer group and the control group ($P>0.017$). Moreover, the polymorphisms of the MEG3 rs7158663 and rs4081134 were not associated with the clinical features of the gastric cancer ($P>0.017$). **Conclusion** MEG3 rs7158663 AG+AA genotype might be one of susceptibility gene of gastric cancer in Chinese Han population.

【Keywords】 long non-coding RNA; maternally expressed gene 3; single nucleotide polymorphism; gastric cancer

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA, 以往认为是转录过程

中的“噪音”, 而近年来发现其具有转录、转录后调控等作用, 参与多种肿瘤疾病的发生及发展^[1-6]。母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 属于 lncRNA 印记基因, 位于人类第 14 号染色体长臂 3 区 2 带 2 亚带。人类多种正常组织中

表达 MEG3,然而在胃癌等肿瘤组织中 MEG3 表达明显降低,通过多种途径介导肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移,并与 TNM 分期、肿瘤大小、预后等临床特征密切相关^[7-14]。单核苷酸多态性可能影响基因表达,进而影响个体对于疾病的易感性^[15-16]。近年来研究^[17-18]显示,MEG3 多态性与结直肠癌和神经母细胞瘤的风险有关。本研究运用病例-对照研究调查 MEG3 两个标签单核苷酸多态性(rs7158663 和 rs4081134)与中国汉族人群胃癌发生的相关性,为鉴定胃癌新的易感基因提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2013 年 3 月至 2017 年 10 月期间于云南省肿瘤医院住院治疗的胃癌患者 172 例,其纳入标准:组织病理学确诊为胃癌患者,否认肿瘤家族史,汉族个体;排除标准:胃癌复发者,其他器官肿瘤转移至胃而非原发病灶者,由于 MEG3 参与心、肺、肝、肾等重要脏器炎症性病变或肿瘤的发生及发展^[19-27],为了避免混杂因素对 MEG3 多态性的影响,排除合并以上病变者。选择同期到云南省肿瘤医院体检中心进行健康体检个体 224 例作为对照,对照人群均为汉族,无肿瘤家族史、急慢性胃炎等其他疾病。所有研究对象签署知情同意后,采集外周静脉血 2~3 mL。

1.2 主要试剂与仪器

全血基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技公司,北京),TaqMan 探针(rs7158663 和 rs4081134 探针编号分别为 C_9693465_10 和 C_1259786_10)和 2×反应混合物(ABI 公司,美国),ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国)。

1.3 DNA 提取及基因分型

采用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,具体操作按照试剂盒说明进行。TaqMan 探针法进行基因分型,10 μL PCR 反应体系如下:DNA 模板 20 ng,2×反应混合物 5.0 μL,TaqMan 探针各 0.25 μL,无菌去离子水补足 10 μL。ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪上运行以下程序:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 60 s,40 个循环。结果判断:红色荧光均为 GG 基因型,绿色荧光均为 AA 基因型,蓝色荧光均为 AG 基因型。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行分析。胃癌组和对照组一般特征比较,包括年龄和性别,分别采用 *t* 检验和 χ^2 检验;Hardy-Weinberg 遗传

平衡和 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌的相关性分析均采用 χ^2 检验,优势比(odds ratio, OR)和 95% 置信区间(confidence interval, CI)用于评价多态性位点与胃癌的风险度,多重比较。校正检验水准 $\alpha=0.017$ 。

2 结果

2.1 胃癌患者和对照人群一般特征及 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

胃癌组男 117 例,女 55 例;年龄(59±13)岁;临床 I+II 期和 III+IV 期患者分别为 82 例和 90 例;高中分化癌和低分化癌分别为 124 例和 48 例;淋巴结有转移 67 例,无转移 105 例;Lauren 分型肠型 82 例,弥漫型 56 例,混合型 34 例;幽门螺旋杆菌感染阳性 153 例,阴性 19 例。对照组男 157 例,女 67 例;年龄(58±10)岁。胃癌组和对照组年龄和性别比较差异无统计学意义($t=-0.59$, $P=0.56$; $\chi^2=0.20$, $P=0.66$)。胃癌组和对照组 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 基因型分布见表 1,经 χ^2 检验,符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P>0.05$),提示 2 组研究对象不存在入选偏倚,具有可比性。

2.2 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性基因型

表 1 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌的关系 [例 (%)]

多态性	对照组	胃癌组 (%)	OR (95% CI) 值*	P 值*
rs7158663				
基因型				
GG	138 (61.6)	83 (48.3)	-	-
AG	76 (33.9)	74 (43.0)	1.61 (1.06, 2.46)	0.027
AA	10 (4.5)	15 (8.7)	2.87 (1.21, 6.82)	0.019
AG+AA	86 (38.4)	89 (51.7)	1.71 (1.14, 2.56)	0.010
等位基因				
G	352 (78.6)	240 (69.8)	1.58 (1.15, 2.19)	0.005
A	96 (21.4)	104 (30.2)		
rs4081134				
基因型				
GG	135 (60.3)	102 (59.3)	-	-
AG	73 (32.6)	58 (33.7)	1.05 (0.68, 1.62)	0.820
AA	16 (7.1)	12 (7.0)	1.02 (0.46, 2.25)	0.970
AG+AA	89 (39.7)	70 (40.7)	1.04 (0.69, 1.56)	0.840
等位基因				
G	343 (76.6)	262 (76.2)	1.02 (0.74, 1.43)	0.880
A	105 (23.4)	82 (23.8)		

*均为校正后,基因型均是以 GG 基因型为参照进行比较

分布比较

MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌的关系见表 1。从表 1 可见, MEG3 rs7158663 在胃癌组和对照组中均检测到 GG、AG 和 AA 三种基因型, AG+AA 基因型分布频率在胃癌组明显高于对照组[校正 OR=1.71, 95%CI 为 (1.14, 2.56), P=0.010]; A 等位基因分布频率在胃癌组明显高于对照组[校正 OR=1.58, 95%CI 为 (1.15, 2.19), P=0.005]。MEG3 rs4081134 在胃癌组和对照组中也均检测到 GG、AG 和 AA 三种基因型, 2 组间的基因型和等位基因分布频率比较差异均无统计学意义 (P>0.017)。

2.3 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌临床特征的关系

MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌临床特征的关系见表 2。从表 2 可见, 经 χ^2 检验并校正年龄和性别, 结果显示, MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌患者的年龄、性别、临床分

期、分化程度、淋巴结转移、Lauren 分型和幽门螺旋杆菌感染状态均无关 (P>0.05)。

3 讨论

lncRNAs 在多种疾病中存在差异性表达, 虽然不编码蛋白, 但是具有重要的调控功能。MEG3, 一种研究较为广泛的 lncRNA, 在包括胃癌等多种肿瘤中呈低表达^[7-10, 13-14]。过表达 MEG3 可抑制细胞增殖、侵袭、迁移、上皮-间质转化并促进细胞凋亡, 这一作用通过多种途径调节完成, 包括: ① 作为竞争性内源 miRNA 竞争结合 miR-181 上调其靶基因 Bcl-2; ② 调节 miR-21 上调 E-钙黏蛋白, 下调 N-钙黏蛋白、锌指转录因子 Snail 和 β -连环素的表达; ③ p53 信号通路^[8-10, 14]。提示 MEG3 可能作为抑癌基因参与胃癌的发生及发展。

由于遗传多态性可影响基因表达, 进而影响疾病的易感性, 因此, 其成为多年来的研究热点^[15-16]。关于 MEG3 遗传多态性与肿瘤的关系, Cao 等^[17]调

表 2 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌临床特征的关系 [例 (%)]

组别	rs7158663 多态性				rs4081134 多态性			
	GG	AG+AA	OR (95% CI) 值*	P 值*	GG	AG+AA	OR (95% CI) 值*	P 值*
年龄 (岁)								
≤58	43 (51.8)	37 (41.6)	1.51 (0.83, 2.76)	0.18	47 (46.1)	33 (47.1)	0.96 (0.52, 1.76)	0.89
>58	40 (48.2)	52 (58.4)			55 (53.9)	37 (52.9)		
性别								
男	52 (62.7)	65 (73.0)	0.62 (0.32, 1.18)	0.14	65 (63.7)	52 (74.3)	0.61 (0.31, 1.19)	0.14
女	31 (37.3)	24 (27.0)			37 (36.3)	18 (25.7)		
临床分期								
I+II	38 (45.8)	44 (49.4)	0.92 (0.50, 1.72)	0.80	53 (52.0)	29 (41.4)	1.56 (0.83, 2.93)	0.17
III+IV	45 (54.2)	45 (50.6)			49 (48.0)	41 (58.6)		
分化程度								
高分化	57 (68.7)	67 (75.3)	0.75 (0.38, 1.47)	0.40	78 (76.5)	46 (65.7)	1.77 (0.90, 3.50)	0.10
低分化	26 (31.3)	22 (24.7)			24 (23.5)	24 (34.3)		
淋巴结转移								
无	50 (60.2)	55 (61.8)	0.98 (0.51, 1.87)	0.95	65 (63.7)	40 (57.1)	0.74 (0.39, 1.43)	0.37
有	33 (39.8)	34 (38.2)			37 (36.3)	30 (42.9)		
Lauren 分型 ^a								
肠型	41 (49.4)	41 (46.1)	1.0		49 (48.0)	33 (47.1)	-	-
弥漫型	24 (28.9)	32 (36.0)	1.28 (0.63, 2.56)	0.49	35 (34.3)	21 (30.0)	0.91 (0.45, 1.85)	0.80
混合型	18 (21.7)	16 (18.0)	0.93 (0.41, 2.10)	0.86	18 (17.6)	16 (22.9)	1.34 (0.58, 3.07)	0.49
幽门螺旋杆菌感染								
阳性	75 (90.4)	78 (87.6)	1.37 (0.51, 3.63)	0.53	91 (89.2)	62 (88.6)	1.06 (0.40, 2.81)	0.90
阴性	8 (9.6)	11 (12.4)			11 (10.8)	8 (11.4)		

*均为校正值。a: Lauren 分型是以肠型为参照进行比较

查了 5 个标签单核苷酸多态性在 518 例结直肠癌和 527 例对照人群中的分布, 发现 MEG3 rs7158663 AA 基因型携带者结直肠癌的发病风险增加了 1.96 倍, 这一高风险见于 60 岁以下和具有家族史结直肠癌患者。Zhuo 等^[18]调查了 2 个标签单核苷酸多态性 (rs7158663 和 rs4081134) 在 392 例儿童神经母细胞瘤和 783 例对照组中的分布, 尽管在整体分析中 2 组间差异无统计学意义, 但是亚组分析显示 rs4081134 AG+AA 基因型携带者更易发展为临床 III ~ IV 期。查阅文献, 未见 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌的相关性研究报道。本研究运用病例-对照研究分析了上述两个多态性位点在 172 例胃癌患者和 224 例健康对照人群中的分布, 发现 rs7158663 AG+AA 基因型和 A 等位基因携带者胃癌的发病风险分别增加了 1.71 和 1.58 倍。由于本研究是初步探索性研究, 纳入样本量较小, 可能没有足够的检验效能, 尤其在分层分析时, 未发现 rs7158663 和 rs4081134 多态性与胃癌临床特征有关。较小的样本量造成随访有效数据极少, 无法进行生存分析以明确 MEG3 多态性与胃癌预后的关系。此外, 本研究样本均来源于同一单位、单一民族。因此, 未来有必要开展多中心、大样本和多种族的合作研究验证本结果, 并分析其与预后的关系。

综上所述, 本研究运用 TaqMan 探针法调查了 MEG3 rs7158663 和 rs4081134 多态性在中国汉族人群胃癌和健康对照人群中的频率分布, 发现携带 rs7158663 AG+AA 基因型和 A 等位基因个体罹患胃癌的风险显著增加, 提示可能是中国汉族人群胃癌的易感基因之一, 关于其作用机制, 有待进一步研究。

参考文献

- 郑斌, 王宇. 长链非编码 RNA UCA1 在消化系统肿瘤中的研究进展. *中国肿瘤*, 2018, 27(3): 209-213.
- 张川, 张新晨. 长链非编码 RNA MEG3 在消化道肿瘤中的研究进展. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(9): 1057-1060.
- 朱栋良, 尹小平, 王芳元. 长链非编码 RNA-MALAT1 对结直肠癌细胞介导的血管形成的影响. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(1): 60-63.
- 唐龙, 唐世磊, 刘古月, 等. 长链非编码 RNA 在常见消化系统肿瘤中的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(8): 1014-1018.
- 杨自国, 郭晓波, 石玉龙, 等. 胃癌转移相关长链非编码 RNA 的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(4): 513-516.
- 王艺超, 李志辉, 陈文杰, 等. 甲状腺乳头状癌相关长链非编码 RNA 的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2017, 24(8): 1030-1034.
- Li C, Liang G, Yao W, *et al.* Differential expression profiles of long non-coding RNAs reveal potential biomarkers for identification of human gastric cancer. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1529-1540.
- Dan J, Wang J, Wang Y, *et al.* LncRNA-MEG3 inhibits proliferation and metastasis by regulating miRNA-21 in gastric cancer. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 931-938.
- Wei GH, Wang X. LncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3850-3856.
- Peng W, Si S, Zhang Q, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 79.
- 孙倩, 刘博巽, 林梦洁, 等. 长链非编码 RNAMEG3 对胃癌细胞增殖的影响. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2014, 34(1): 1-6.
- 韩韬, 何晓璞, 刘静, 等. 长链非编码 RNA MEG3 抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的研究. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(11): 1504-1508.
- 孟菲菲, 司君利, 解祥军, 等. 长链非编码 RNAs MEG3 和 GAS5 在胃癌组织中的表达及其与预后的关系. *中国临床研究*, 2016, 29(11): 1449-1452, 1457.
- Xu G, Meng L, Yuan D, *et al.* MEG3/miR 21 axis affects cell mobility by suppressing epithelial mesenchymal transition in gastric cancer. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 39-48.
- Sun R, Liang Y, Yuan F, *et al.* Functional polymorphisms in the promoter region of miR-17-92 cluster are associated with a decreased risk of colorectal cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82531-82540.
- Yuan F, Sun R, Li L, *et al.* A functional variant rs353292 in the flanking region of miR-143/145 contributes to the risk of colorectal cancer. *Sci Rep*, 2016, 6: 30195.
- Cao X, Zhuang S, Hu Y, *et al.* Associations between polymorphisms of long non-coding RNA MEG3 and risk of colorectal cancer in Chinese. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 19054-19059.
- Zhuo ZJ, Zhang R, Zhang J, *et al.* Associations between lncRNA MEG3 polymorphisms and neuroblastoma risk in Chinese children. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(3): 481-491.
- Piccoli MT, Gupta SK, Viereck J, *et al.* Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched lncRNA Meg3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Circ Res*, 2017, 121(5): 575-583.
- Gong WJ, Peng JB, Yin JY, *et al.* Association between well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms and platinum-based chemotherapy toxicity in Chinese patients with lung cancer. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4): 581-590.
- Zhang Z, Liu T, Wang K, *et al.* Down-regulation of long non-coding RNA MEG3 indicates an unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer: Evidence from the GEO database. *Gene*, 2017, 630: 49-58.
- Wang P, Chen D, Ma H, *et al.* LncRNA MEG3 enhances cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer by regulating miR-21-5p/SOX7 axis. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 5137-5149.
- Li R, Fang L, Pu Q, *et al.* MEG3-4 is a miRNA decoy that regulates IL-1 β abundance to initiate and then limit inflammation to prevent sepsis during lung infection. *Sci Signal*, 2018, 11(536): pii: eaao2387.
- Wang Q, Li M, Shen Z, *et al.* The long non-coding RNA MEG3/miR-let-7c-5p axis regulates ethanol-induced hepatic

- steatosis and apoptosis by targeting NLRC5. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 302.
- 25 He JH, Han ZP, Liu JM, *et al.* Overexpression of long non-coding RNA MEG3 inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma Huh7 cells via negative modulation of miRNA-664. *J Cell Biochem*, 2017, 118(11): 3713-3721.
- 26 Wang M, Huang T, Luo G, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 induces renal cell carcinoma cells apoptosis by activating the mitochondrial pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(4): 541-545.
- 27 He H, Dai J, Zhuo R, *et al.* Study on the mechanism behind lncRNA MEG3 affecting clear cell renal cell carcinoma by regulating miR-7/RASL11B signaling. *J Cell Physiol*, 2018 Jul 3.

收稿日期: 2018-05-23 修回日期: 2018-09-06

本文编辑: 蒲素清