长链非编码 RNA *XLOC_005009* 在食管鳞状细胞癌中的表达及其甲基化状态

刘胜男，董稚明，邝　钢，师雅斌，郭艳丽，沈素朋，梁　佳，郭　炜
（河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所，河北 石家庄 050011）

摘　要：［目的］通过检测长链非编码 RNA *XLOC_005009* 在人食管癌细胞系及食管鳞状细胞癌（ESCC）组织中的表达情况及其甲基化状态，探讨 *XLOC_005009* 基因在食管鳞癌发生、发展中的作用及表观遗传学失活机制。［方法］分别应用逆转录—聚合酶链反应以及甲基化特异性聚合酶链反应的方法检测 *XLOC_005009* 基因在 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-dC 处理前后的食管癌细胞系（TE1、TE13、T.Tn、Eca109）以及 57 例食管鳞癌组织及相应癌旁正常组织中的表达情况和各位点的甲基化状态。［结果］*XLOC_005009* 基因的表达在 5-Aza-dC 处理后的 4 株细胞系中表达增高，在 5-Aza-dC 处理前的 4 株细胞系中 *XLOC_005009* 基因的 3 个位点均表现为高甲基化状态，在 5-Aza-dC 处理后，各位点甲基化程度均降低。*XLOC_005009* 基因在 ESCC 中的表达明显低于对应癌旁正常组织（0.21±0.22 *vs* 0.32±0.29，*P*<0.05），其远端 CpG 岛及第 2 外显子区甲基化率在 ESCC 与其癌旁正常组织中差异无统计学意义，且其在发生甲基化的 ESCC 与未发生甲基化的 ESCC 中的表达无统计学差异。第一外显子区甲基化率在 ESCC 中显著高于其癌旁正常组织［45.61%（26/57）*vs* 19.30%（11/57），*P*<0.05］，并与淋巴结转移、组织分化程度及 TNM 分期密切相关，且此位点发生甲基化的 ESCC 中该基因的表达显著低于未发生甲基化的 ESCC 组织（0.06±0.06 *vs* 0.33±0.23，*P*<0.05）。［结论］*XLOC_005009* 基因在食管癌细胞系和 ESCC 中的低表达与 ESCC 的发生、发展密切相关，且其第一外显子区甲基化异常增高可能是导致其表达沉默的机制之一。

关键词：食管癌；鳞癌；*XLOC_005009*；长链非编码 RNA；DNA 甲基化
中图分类号：R735.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1004-0242（2017）03-0219-07
doi：10.11735/j.issn.1004-0242.2017.03.A011

Expression and Methylation Status of Long Non-coding RNA *XLOC_005009* in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

LIU Sheng-nan，DONG Zhi-ming，KUANG Gang，et al.
（Cancer Institute of Hebei Province，Shijiazhuang 050011，China）

Abstract：［Purpose］To investigate the expression and methylation status of long non-coding RNA *XLOC_005009* in human esophageal cancer cell lines and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues. ［Methods］Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and methylation specific polymerase chain reaction (MSP) methods were applied to detect the expression and methylation status of *XLOC_005009* in esophageal cancer cell lines (TE1，TE13，T.TN and E-ca109) treated or untreated with DNA methylation transferase inhibitor 5-Aza-dC and ESCC tissues and the corresponding noncancerous tissues. ［Results］The expression of *XLOC_005009* in 4 treated cell lines was increased. Each site of *XLOC_005009* gene showed hypermethylation in the 4 untreated cell lines，after 5-Aza-dC treatment，the methylation status of *XLOC_005009* was decreased. The expression of *XLOC_005009* in ESCC tissues was significantly lower than that in corresponding normal tissues (0.21 ±0.22 *vs* 0.32 ±0.29，*P* <0.05). Methylation frequency of *XLOC_0059009* in the distal CpG islands and the exon 2 region was not significantly different between ESCC tissues and corresponding normal tissues. The expression of *XLOC_005009* in ESCC tissues with *XLOC_005009* methylation in the distal CpG islands and the exon 2 region was not significantly different from that in ESCC tissues without methylation of both regions. Methylation frequency of *XLOC_0059009* in the exon 1 region was significantly higher in ESCC tissues than that in corresponding normal tissues ［45.61%(26/57) *vs* 19.30%(11/57)，*P*<0.05］，and was closely correlated with lymph node metastasis，pathological differentiation and TNM stages. The expression of *XLOC_005009* in ESCC tissues with *XLOC_005009* methylation in the exon 1 was significantly

收稿日期：2016-03-16；修回日期：2016-05-09
基金项目：国家自然科学基金（81472335）；河北省自然科学基金（H2015206196）
通讯作者：郭炜，E-mail：guowei7303@163.com

lower than that in ESCC tissues without methylation of this region (0.06±0.06 *vs* 0.33±0.23, $P<0.05$). [Conclusion] The decreased expression of *XLOC_005009* is closely related to the occurrence and development of ESCC and its exon 1 region methylation may be one of the mechanisms to lead to the silence of *XLOC_005009*.
Key words: esophageal cancer; squamous cell carcinoma; *XLOC_005009*; long non-coding RNA; DNA methylation

长链非编码 RNA（long non-coding RNA，lncRNAs）曾经被认为不具有任何生物学功能，被称为是基因组转录的“噪音”[1]。然而，近年来研究发现这些“噪音”基因组可能发挥重要的生物学作用，并有研究证明，lncRNAs 在各种疾病中都有异常表达，其中包括癌症。研究认为 lncRNAs 的表达能够通过 DNA 甲基化来调控，其启动子区 CpG 岛发生甲基化后，会抑制该基因的转录，如果抑癌基因启动子区 CpG 岛发生甲基化就很可能导致肿瘤的发生[2]，并且不同位点的甲基化率不同，会对基因的沉默有一定的影响[3]。本文旨在研究 XLOC_005009 在食管鳞癌细胞系和食管鳞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）组织中的表达与各位点甲基化状态之间的关系，并结合临床及病理资料，分析该基因在食管鳞癌细胞系和 ESCC 的发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂

逆转录试剂盒（Promega）；绿色体系（Promega）；蓝色体系（Promega）；Wizard DNA 纯化试剂盒（Promega）；蛋白酶 K（Ambion 公司）；胎牛血清（BI 公司）；RPMI1640 培养基（Gibco 公司）；5-氮杂-2′-脱氧胞苷（5-Aza-2′-deoxycytidine，5-Aza-dC）（Gibco 公司）；Trizol（索莱宝公司）；所用引物均在北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.1.2 食管癌细胞系培养

食管癌细胞系 TE1、TE13、T.TN、ECa109 均由河北医科大学第四医院肿瘤研究所病理研究室保留并传代。所有细胞系培养均用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养。应用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2′-脱氧胞苷（5-Aza-dC）（终浓度 5μmol/L）作用于 TE1、TE13、T.TN、EC109 细胞系，每 24h 更换培养液，培养 48h，第 3d 换成全血清培养基培养 24h 后收集细胞。

1.1.3 研究对象和标本来源

标本取自 2013~2015 年河北医科大学第四医院的 ESCC 手术患者，共 57 例，全部患者术前均未接受任何放、化疗，其中男性 36 例，女性 21 例，年龄 48~70 岁，中位年龄 61 岁。每例患者均取 ESCC 原发灶组织及距原发灶边缘 3~5cm 以上的相应癌旁正常组织。手术切除标本一部分常规制作蜡块行 HE 染色；另一部分在新鲜状态放入 -80℃低温冰箱保存，用来提取 RNA 与 DNA。所有组织标本经 HE 染色确定为 ESCC 组织，癌旁组织均未见癌细胞浸润。根据国际抗癌联盟（Union for International Cancer Control，UICC）的标准进行 TNM 分期：Ⅰ期 4 例（7.0%），Ⅱ期 32 例（56.1%），Ⅲ期 18 例（31.6%），Ⅳ期 3 例（5.3%）。根据肿瘤的病理学分级：57 例患者中高分化 23 例（40.4%），中分化 15 例（26.3%），低分化 19 例（33.3%）。有淋巴结转移 22 例（38.6%），无淋巴结转移 35 例（61.4%）。

1.2 方 法

1.2.1 逆转录—聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）方法检测 *XLOC_005009* 基因在食管癌细胞系及 ESCC 组织中的表达

根据 Trizol 试剂说明书提取步骤提取 5-Aza-dC 处理前后的食管癌细胞系及组织标本中的总 RNA，再根据反转录试剂盒说明书步骤将提取的 RNA 反转录成 cDNA，之后以反转好的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，选用 GAPDH 作为内参照。引物、退火温度及产物大小见表 1（Table 1）。RT-PCR 反应条件为：95℃预变性 10min；95℃变性 45s、退火 45s、72℃延伸 50s（35 个循环）；72℃再延伸 7min，4℃保存。将反应好的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，采用 GeneSys 软件对电泳图像中目的基因

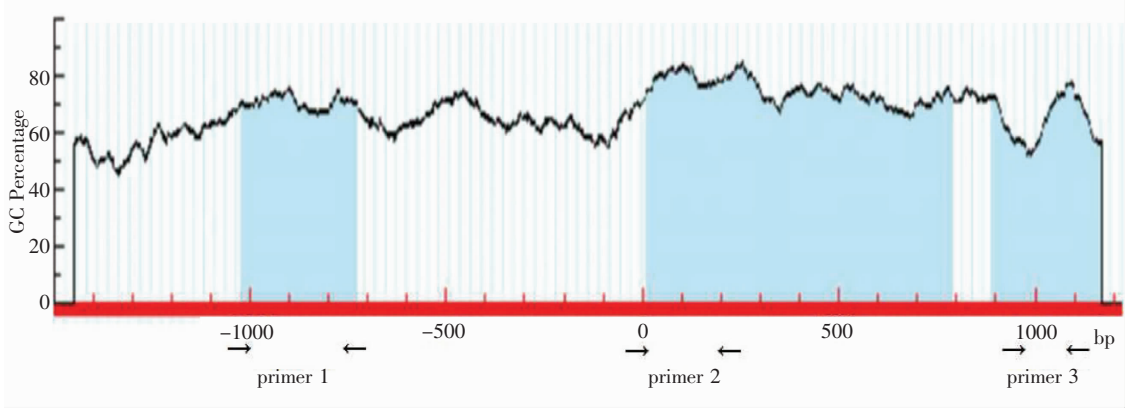
*XLOC_005009*mRNA 表达水平进行半定量分析。用软件 Gel Pro Analysizer 3.1 测定目的基因灰度值，以内参照 *GAPDH* 的 OD 值标化基因的 OD 值，即得到相对表达量。实验重复 3 次取平均值。

1.2.2 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction，MSP)检测食管癌细胞系及 ESCC 组织中 *XLOC_005009* 基因的各位点甲基化状态

采用酚/氯仿抽提法提取 5-Aza-dC 处理前后的食管癌细胞系及组织标本中的 DNA。之后按照 DNA 纯化试剂盒说明书对所提的 DNA 进行纯化。根据 Meth Primer 预测 *XLOC_005009* 基因启动子区 CpG 岛结果，分别选择了远端 CpG 岛（−1020bp~−727bp）、第一外显子区(10bp~787bp)、第二外显子区(888bp~1160bp）共 3 个部位进行甲基化状态的分析，分别设计相应的各位点甲基化引物，检测该基因各位点的甲基化状态(Figure 1)。之后应用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增，引物序列、退火温度及产物大小见表 1(Table 1)。反应条件为：95℃预变性10min；95℃变性 45s、退火 45s、72℃延伸 50s(35 个循环)；72℃再延伸 7min，4℃保存。MSP 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，用凝胶电泳成像及 GeneSys 图像分析系统进行分析。MSP 结果会出现 3 种情况：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没有扩增出目的条带；②不完全甲基化：甲基化特异性及非特异性引物

Table 1 Primer sequences and reaction conditions of RT-PCR and MSP of *XLOC_005009*

Types	Primer sequence	Annealing temperature (℃)	Product size (bp)
RT-PCR			
XLOC_005009	F:5′-GATGTAGCGAACCAGCAG-3′ R:5′-AACGAACGAACGAACGAA -3′	57	329
GAPDH	F: 5′- AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG -3′ R: 5′- AGGGGTCATTGATGGCAACA -3′	57	104
MSP			
Distal CpG island			
Methylation	F:5′-TGGGTCGGGTCGGTTTTTTGTTTCG-3′ R:5′-CCGAAAAATAACAACGCGACAACCG-3	59	222
Unmethylation	F:5′-TGGGTTGGGTTGGTTTTTTGTTTTG-3′ R:5′-CCAAAAAATAACAACACAACAACCA-3	57	222
Exon 1			
Methylation	F:5′-TTCGTTTTGGTTTCGTTCGTATGCG-3′ R:5′-AACTAAATATTCGCCGAAACCTACG-3′	51	185
Unmethylation	F: 5′- TTTGTTTTGGTTTTGTTTGTATGTG-3′ R:5′-AACTAAATATTCACCAAAACCTACA-3′	48	185
Exon 2			
Methylation	F:5′-TTCGTTCGTTCGGGTAGTAATGTCG-3′ R:5′-AAACACCTCCGAACGCTACGACG-3′	57	108
Unmethylation	F:5′-TTTGTTTGTTTGGGTAGTAATGTTG-3′ R:5′-AAACACCTCCAAACACTACAACA-3′	54	108



Blue region：position of CpG island (−1020~−727，10~787，888~1160) ；→←：the location of MSP primer；0：Transcription initiation site.

Figure 1 CpG island distribution of *XLOC_005009* and location of MSP primer

均扩增出目的条带;③非甲基化:甲基化引物未扩增出目的条带,非甲基化特异引物扩增出目的条带。甲基化率为发生完全甲基化和不完全甲基化标本数占总的标本数的百分比。

MSP 阳性对照组为经甲基化酶 Sss Ⅰ处理以后的 DNA 为模板，阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板,并随机选取 10%的标本进行重复试验。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析，*XLOC_005009* 在 ESCC 及相应癌旁正常组织之间的 mRNA 表达差异应用配对 *t* 检验,*XLOC_005009* 在 ESCC 及相应癌旁组织之间的 mRNA 表达的差异与临床病理资料分析采用 *t* 检验和近似 *t* 检验，MSP 实验结果与临床病理资料间的关系采用 χ^2 和校正 χ^2 检验，以上均为双侧检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

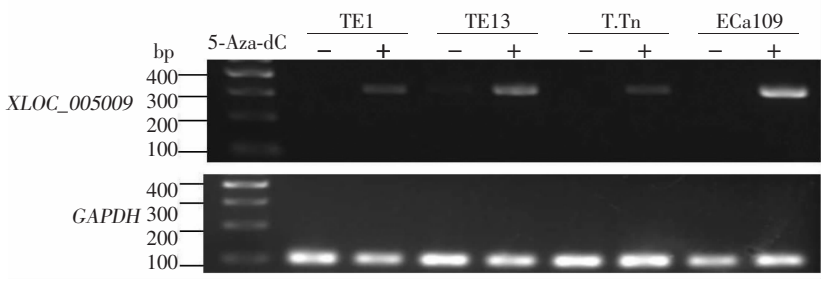
2 结 果

2.1 食管癌细胞系中 *XLOC_005009* 基因的表达及甲基化状态

实验结果采用 GeneSys 软件对电泳图像中目的基因 *XLOC_005009* mRNA 表达水平进行分析,以内参照 *GAPDH* 在细胞中表达标化基因在细胞中的表达,未有目的条带扩出为阴性,有目的条带扩出但条带亮度较暗为弱阳性,有目的条带扩出且目的条带较亮为阳性。5-Aza-dC 处理前,TE1、T.TN、Eca109 中 *XLOC_005009* 基因表达阴性,TE13 表达弱阳性,5-Aza-dC 处理后，TE1、T.TN、Eca109 细胞系中该基因均表达阳性,TE13 表达上调(Figure 2)。在 5-Aza-dC 处理前,*XLOC_005009* 基因远端 CpG 岛、第一外显子区，第二外显子区在 4 株食管癌细胞系中均表现为高甲基化状态。应用 5-Aza-dC 处理后,远端 CpG 岛在 TE13、T.Tn、Eca109 细胞系中甲基化程度降低,非甲基化程度增高,TE1 细胞系中该位点表现为非甲基化状态；第一外显子区在 TE13 细胞系中甲基化程度降低,非甲基化程度增加,其余 3 种细胞系中该位点均表现为非甲基化状态；第二外显子区在 TE13、Eca109 细胞系中甲基化程度降低，非甲基化程度增加,TE1、T.Tn 细胞系中该位点均表现为非甲基化状态(Figure 3)。

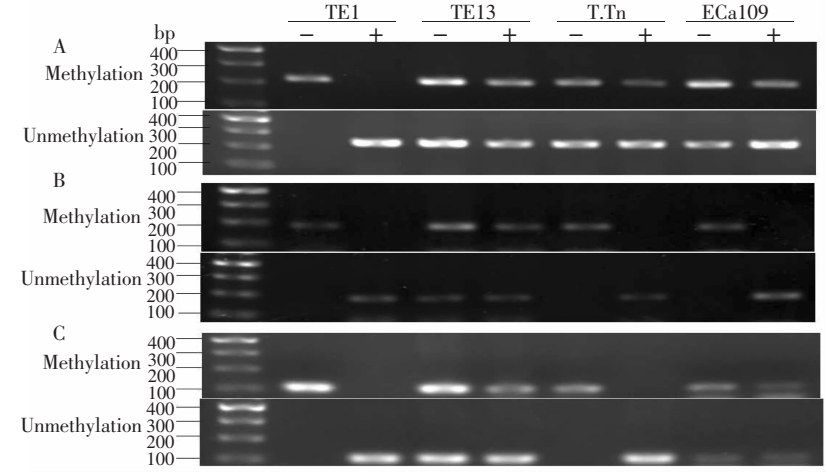
2.2 ESCC 组织及其癌旁正常组织中 *XLOC_005009* 基因的表达

XLOC_005009 基因在 ESCC 组织中的相对表达量显著低于相应癌旁正常组织 ($P<0.05$)(Figure 4)。分析不同临床病理特征发现,*XLOC_005009* 基因在



Note:−:untreated with 5-Aza-dC;+:treated with 5-Aza-dC.

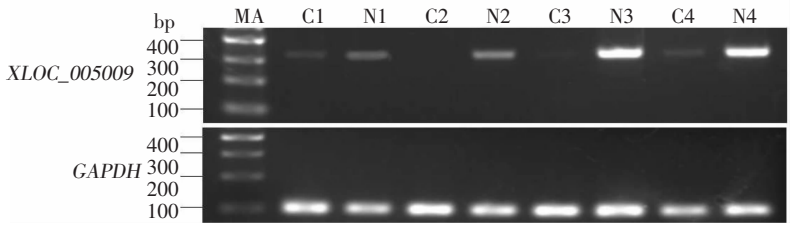
Figure 2 Expression of *XLOC_005009* mRNA in esophageal cancer cell lines before and after treated with 5-Aza-dC



Note:A:the distal CpG island;B:exon 1;C:exon 2;−:untreated with 5-Aza-dC;
+:treated with 5-Aza-dC.

Figure 3 Methylation of *XLOC_005009* gene in esophageal cancer cell lines before and after treated with 5-Aza-dC

发生淋巴结转移的 ESCC 组织中表达低于未发生淋巴结转移的ESCC[0.03±0.03 *vs* 0.32±0.21, *P*<0.05]；在低分化组 ESCC 中的表达低于中高分化组[0.04±0.03 *vs* 0.29±0.22, *P*<0.05]；在Ⅲ~Ⅳ期 ESCC 的表达低于Ⅰ~Ⅱ期组织 [0.03±0.02 *vs* 0.31±0.21, *P*<0.05]。不同年龄、性别 *XLOC_005009* 基因的表达差异均无统计学意义(*P*>0.05)(Table 2)。



Note: MA: marker; C(1~3) : ESCC tissues; N(1~3) : corresponding normal tissues.

Figure 4 Expression of *XLOC_005009* mRNA in ESCC and corresponding normal tissues

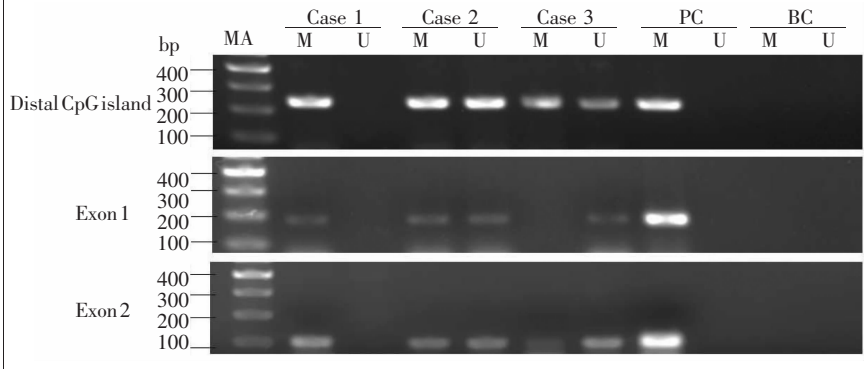
Table 2 The relationship between mRNA expression of *XLOC_005009* gene and clinicopathologic features in ESCC tissues

Features	N	*XLOC_005009* mRNA	*P*
Age(years old)			
≤60	29	0.21±0.20	0.902
> 60	28	0.21±0.24	
Gender			
Male	36	0.23±0.23	0.230
Female	21	0.16±0.19	
Lymph node metastasis			
Positive	22	0.03±0.03	<0.001
Negative	35	0.32±0.21	
Pathological differentiation			
Well/moderate	38	0.29±0.22	<0.001
Poor	19	0.04±0.03	
TNM stage			
Ⅰ~Ⅱ	36	0.31±0.21	<0.001
Ⅲ~Ⅳ	21	0.03±0.02	

2.3 *XLOC_005009* 基因在 ESCC 组织及其癌旁正常组织中甲基化状态

本研究分别检测了 *XLOC_005009* 基因在 57 例 ESCC 组织及其癌旁正常组织中的远端 CpG 岛、第一外显子区、第二外显子区的甲基化状态(Figure 5)。

XLOC_005009 基因远端 CpG 岛甲基化率在 ESCC 及其癌旁正常组织中差异无统计学意义 [77.19%(44/57)*vs* 68.42%(39/57), *P*=0.29)]。结合不同临床病理特征进行分析，远端 CpG 岛区域甲基化率与淋巴结转移、肿瘤分化程度、临床分期、年龄、性别等均无统计学意义相关(*P*>0.05)(Table 3)。



Note: Case 1: methylated; case 2: hemi-methylated; case 3: unmethylated; PC: positive control; BC: blank control; M: methylated; U: unmethylated; MA: 100bp DNA Maker.

Figure 5 Methylation of *XLOC_005009* in ESCC and corresponding normal tissues

XLOC_005009 基因第一外显子区甲基化率在 ESCC 中显著性高于癌旁正常组织[45.61%(26/57)*vs* 19.30%(11/57), *P*<0.05]。结合不同临床病理特征发现，第一外显子区甲基化率在发生淋巴结转移的 ESCC 标本中高于未发生淋巴结转移的 ESCC 标本 [63.6%(14/22)*vs* 34.3%(12/35), *P*<0.05]；在低分化组的 ESCC 标本中显著高于中高分化组 [68.4%(13/19)*vs* 34.2%(13/38), *P*<0.05]；在Ⅲ~Ⅳ期 ESCC 标本中显著高于Ⅰ~Ⅱ期 [66.7%(14/21)*vs* 33.3%(12/36), *P*<0.05]。

不同年龄、性别甲基化率差异均无统计学意义（P>0.05）(Table 3)。

XLOC_005009 基因第二外显子区甲基化率在 ESCC 及其癌旁正常组织中差异无统计学意义［66.67%(38/57) *vs* 54.39%(31/57), P=0.18)］。结合不同临床病理特征发现，第二外显子区甲基化率在低分化组 ESCC 标本中高于中高分化组[84.2%(16/19) *vs* 57.9%(22/38), P=0.047]。不同淋巴结转移、临床分期、年龄、性别分组，其甲基化率差异均无统计学意义（P>0.05)(Table 3)。

Table 3 ***XLOC_005009*** **methylation status in the various regions and its relationship with clinicopathological features**

Features	N	Methylation frequency					
		Distal CpG island		Exon 1		Exon 2	
		N(%)	*P*	N(%)	*P*	N(%)	*P*
Age(years old)							
≤60	29	22(75.9)	0.807	15(51.7)	0.346	18(62.1)	0.454
> 60	28	22(78.6)		11(39.3)		20(71.4)	
Gender							
Male	36	26(72.2)	0.242	14(63.6)	0.750	23(63.9)	0.560
Female	21	18(85.7)		12(34.3)		15(71.4)	
Lymph node metastasis							
Positive	22	18(81.8)	0.509	14(63.6)	0.030	17(77.3)	0.178
Negative	35	26(74.3)		12(34.3)		21(60.0)	
Pathological differentiation							
Well/moderate	38	28(73.7)	0.372	13(34.2)	0.030	16(84.2)	0.047
Poor	19	16(84.2)		13(68.4)		22(57.9)	
TNM stage							
Ⅰ~Ⅱ	36	26(72.2)	0.242	12(33.3)	0.015	38(66.7)	0.244
Ⅲ~Ⅳ	21	18(85.7)		14(66.7)		16(76.2)	

并且实验结果显示，ESCC 中第一外显子区甲基化率低于远端 CpG 岛和第二外显子区甲基化率，[45.61%(26/57) *vs* 77.19%(44/57), P=0.001；45.61%(26/57) *vs* 66.67%(38/57), P=0.024]；而远端 CpG 岛甲基化率与第二外显子区甲基化率在 ESCC 中差异无统计学意义[77.19%(44/57) *vs* 66.67%(38/57), P=0.211]。

2.4 ESCC 中 *XLOC_005009* 基因的表达与各位点甲基化的关系

XLOC_005009 基因的 mRNA 相对表达量在远端 CpG 岛发生甲基化的 ESCC 中与未发生甲基化的 ESCC 中差异无统计学意义（0.18±0.20 *vs* 0.29±0.25, P=0.11)；*XLOC_005009* 基因的 mRNA 相对表达量在第一外显子区发生甲基化的 ESCC 中显著低于未发生甲基化的 ESCC（0.06±0.06 *vs* 0.33±0.23, P<0.05)；*XLOC_005009* 基因的 mRNA 相对表达量在第二外显子区发生甲基化的 ESCC 中与未发生甲基化的 ESCC 差异无统计学意义（0.17±0.21 *vs* 0.27±0.23, P=0.086)(Table 4)。

Table 4 The relationship between methylation status and mRNA expression of *XLOC_005009* in ESCC

Methylation status	*XLOC_005009* mRNA	*t*	*P*
Distal CpG island			
Methylation	0.18±0.20	−1.626	0.110
Unmethylation	0.29±0.25		
Exon 1			
Methylation	0.06±0.06	−6.252	<0.001
Unmethylation	0.33±0.23		
Exon 2			
Methylation	0.17±0.21	−1.750	0.086
Unmethylation	0.27±0.23		

3 讨 论

研究发现人类基因组编码蛋白质的约 20 000 个基因占总序列的 2%，并且随着基因微阵列和全基因组转录测序技术的进步证实 90%的基因组是可转录的，其转录产物多为非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)，而其又可以分为小非编码 RNA(small ncRNA, snaRNA)和 lncRNAs[4]。有研究发现 lncRNAs 具有多种重要的生物学功能，因此，LncRNA 逐渐成为研究的热点，尤其在肿瘤相关的疾病方面。已经有研究证实 lncRNAs 在肿瘤组织中有异常表达，例如 H19 在某些肿瘤中表达[5]，HULC 在肝癌中呈现高表达[6]，LSINCT5 在乳腺癌和卵巢癌中呈现高表达[7]，SBF2-AS1 在肺癌中高表达[8]等。这些研究都说明lncRNAs 与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。

DNA 甲基化是肿瘤发生、发展的一个重要因素，研究证明区域特异性的甲基化水平升高与肿瘤

的发生密切相关[9]。研究表明一些 lncRNAs 异常甲基化模式可能涉及癌症发展[10],并有文献报道,不同位点的甲基化可能对基因的沉默产生不同的影响[3]。*XLOC_005009* 基因位于人染色体 5q31.1,mRNA 序列有 4 个转录本,转录本 1 为其主要的转录序列。有研究通过基因芯片显示,*XLOC_005009* 在膀胱癌中的表达与其对应的正常组织相比呈现下调趋势[11],有研究通过 TCGA 筛选出 *XLOC_005009* 在乳腺癌与肺鳞癌中呈现异常甲基化趋势 [9]。我们经Meth Primer 预测了该基因启动子区 CpG 岛的分布情况,显示 *XLOC_005009* 基因有 3 个 CpG 岛,长度分别为 294bp、778bp、273bp。本研究分别选取了 *XLOC_005009* 基因远端 CpG 岛,第一外显子区富含 CpG 位点的部位,第二外显子区富含 CpG 位点的部位进行分析,进而分析该基因在 ESCC 及其癌旁正常组织的表达情况及甲基化状态,以及不同部位的甲基化状态对该基因表达的影响。

本研究发现 *XLOC_005009* 在经 5-Aza-dC 处理的食管癌细胞系中表达相对较高,并且 *XLOC_005009* 在组织样本中的表达显著性低于其相应癌旁正常组织,这一结果提示 *XLOC_005009* 在 ESCC 中可能起抑癌基因的作用。同时我们还发现 *XLOC_005009* 基因 3 个部位在 5-Aza-dC 处理前的 4 株食管癌细胞系中均表现为高甲基化状态,应用 5-Aza-dC 处理后,其甲基化程度均有所降低或表现为非甲基化。这一结果提示,*XLOC_005009* 基因的高甲基化状态可能是其表达沉默的原因之一。进一步研究发现,该基因远端 CpG 岛和第二外显子区在 ESCC 及癌旁正常组织中均呈现异常高甲基化状态,且甲基化率可高达 77.19%,但这两个部位的甲基化率在肿瘤组织及癌旁正常组织中却无明显差异。*XLOC_005009* 基因第一外显子区在 ESCC 组织中的甲基化率远低于远端 CpG 岛和第二外显子区,但该位点甲基化率在肿瘤组织及癌旁正常组织中却有显著性差异,并且与该基因在 ESCC 组织中的表达呈明显负相关,且该位点甲基化率与 ESCC 的淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期密切相关,提示 *XLOC_005009* 基因在 ESCC 中表达下调可能与其第一外显子区的异常高甲基化有关,该位点为该基因的关键性 CpG 位点,第一外显子区 DNA 甲基化可能是 ESCC 中 *XLOC_005009* 基因表达下调的主要机制之一,并对该基因的表达起关键的调控作用。

总之,本研究提示 *XLOC_005009* 基因在食管鳞癌中表达降低,其表达沉默与第一外显子区域的异常高甲基化密切相关,该关键性 CpG 位点的异常高甲基化可能是导致其在 ESCC 中表达下调的重要机制之一。

参考文献:

[1] Li XL,Wu ZQ,Fu XB,et al. Long non-coding RNAs:insights from biological features and functions to diseases [J]. Med Res Rev,2013,33(3):517-553.

[2] Kristensen LS,Raynor MP,Candiloro I,et al. Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes [J]. Oncotarget,2012,3(4):450-461.

[3] Ge MH,Chen C,Xu JJ,et al. Critical regions and spreading of runt-related transcription factor-3 C-phosphate-G (CpG) island methylation in human salivary gland adenoid cystic carcinoma[J]. Hum Pathol,2011,42(12):1862-1872.

[4] Gibb EA,Brown CJ,Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas [J]. Mol Cancer,2011,10:38.

[5] Raveh E,Matouk IJ,Gilon M,et al. The H19 long non-coding RNA in cancer initiation,progression and metastasis-a proposed unifying theory[J]. Mol Cancer,2015,14:184.

[6] Du Y,Kong G,You X,et al. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18 [J]. J Biol Chem,2012,287(31):26302-26311.

[7] Silva JM,Boczek NJ,Berres MW,et al. LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation [J]. RNA Biol,2011,8(3):496-505.

[8] Lv J,Qiu M,Xia W,et al. High expression of long non-coding RNA SBF2-AS1 promotes proliferation in non-small cell lung cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res,2016,35:75.

[9] Aran D,Hellman A. DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition [J]. Cell,2013,154(1):11-13.

[10] Zhi H,Ning S,Li X,et al. A novel reannotation strategy for dissecting DNA methylation patterns of human long intergenic non-coding RNAs in cancers [J]. Nucleic Acids Res,2014,42(13):8258-8270.

[11] Zhu YP,Bian XJ,Ye DW,et al.Long noncoding RNA expression signatures of bladder cancer revealed by microarray[J]. Oncol Lett,2014,7(4):1197-1202.