

DNA 甲基化相关 lncRNA 与消化道肿瘤关系的研究进展

王欢, 辛彦

(中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:表观遗传(epigenetics)指在基因组 DNA 序列不发生改变的情况下,基因表达发生可遗传改变,该现象普遍存在于动植物中,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、基因组印迹、随机染色体失活及非编码 RNA(ncRNA)的调节作用等。ENCODE 计划及随后的研究发现,人类基因组中仅有很小一部分 DNA 序列负责编码蛋白质,而其余大部分被转录为非编码 RNA。其中长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度大于 200nt 并且缺乏蛋白质编码能力的 RNA 分子。越来越多的研究表明,lncRNA 能够通过表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等多个层面调节基因的表达,从而参与细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程。本文结合国内外最新报道,对参与 DNA 甲基化的 lncRNA 在消化道肿瘤中的研究进展作一综述。

关键词:lncRNA;DNA 甲基化;消化道肿瘤

中图分类号:R735 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2016)02-0139-06

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2016.02.B013

Progress in the Relationship of DNA Methylation-related LncRNA with Gastrointestinal Tumors

WANG Huan, XIN Yan

(The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, China)

Abstract:Epigenetics refers to the case that heritable alteration of gene expression occurs while the genomic DNA sequence does not change. This phenomenon exists commonly in plants and animals, including DNA methylation, histone modifications, genomic imprinting, random chromosome inactivation and regulation of non-coding RNA (non-coding RNA, ncRNA). The outcome of ENCODE project and subsequent studies have revealed that only a small portion of human genome encodes proteins, while the vast majority are transcribed as non-coding RNA (ncRNA). Long non-coding RNA (lncRNA) is commonly defined as an RNA molecule which is larger than 200 nucleotides (nt) and is not translated into proteins. Growing evidences have suggested that lncRNAs can regulate gene expression at various levels including epigenetic regulation, transcriptional regulation and post-transcriptional regulation, and they are involved in a wide variety of biological processes, such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. In this paper, we make a review on the lncRNAs involving in DNA methylation and the recent advances of how they function in gastrointestinal tumors.

Subject words:lncRNA; DNA methylation; gastrointestinal neoplasms

1 lncRNA 的概述

lncRNA 通常是一类转录本长度大于 200nt, 缺

乏蛋白质编码能力的功能性 RNA 分子^[1,2]。与 mRNA 类似,大多数 lncRNA 由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNA pol II)转录,经过剪接加工而成熟^[2]。一些成熟的 lncRNA 与 mRNA 一样也具有 5'帽子结构和 3'多聚腺苷酸尾^[2,3]。近来研究表明,在人类机体中,估计有 15 000 种 lncRNA,大部分 lncRNA 显示了不同的组织特异性^[4,5]。lncRNA 具有不同的亚细胞定位,并在不同的细胞定位中起不同的作用,尤其是在细胞核中。根据他们在基因组上相对于蛋白

基金项目:国家自然科学基金(81071650;30973503;81050007);辽宁省科技厅科学技术计划项目(2013225303-103;2011404013-3);辽宁省高等学校攀登学者计划(2009-2012)

通讯作者:辛彦,主任,教授,博士生导师,博士;中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所胃肠肿瘤病理研究室、普通外科研究所肿瘤病理研究室,辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号(110001);E-mail:yxin@mail.cmu.edu.cn

收稿日期:2015-06-10; **修回日期:**2015-09-17

编码基因的位置和特征,可将 lncRNA 分为五大类:①正义 lncRNA(sense lncRNA):与同一条链上蛋白编码基因转录方向相同;②反义 lncRNA(anti-sense lncRNA):与同一条链上蛋白编码基因转录方向相反;③双向 lncRNA(bidirectional lncRNA):可同时向同一条链上蛋白编码基因转录方向相同或相反的方向转录;④基因内 lncRNA(intronic lncRNA):从基因的内含子区转录得到;⑤基因间 lncRNA(intergenic lncRNA):从两个基因间的区域转录得到,即 lincRNA。大多数 lncRNA 在结构和功能上具有一些共同的特征:① lncRNA 缺乏有意义的开放阅读框架,无蛋白质编码能力;② lncRNA 的一级结构保守性较差,而在二级结构和剪接模式等方面表现出功能上的保守性;③ lncRNA 具有较高的组织或细胞特异性^[6,7]。然而,越来越多的研究表明,lncRNA 能以更加敏感与快速的方式为机体提供精细而微妙的调节^[7]。相比于小 ncRNA 而言,lncRNAs 有着更加长的核苷酸序列以及更加复杂的二级结构,可以通过与 DNA、RNA 或蛋白质相互作用来行使信号、诱饵、引导和支架等多种分子功能^[8,9]。

lncRNA 初发现时被认为是转录噪音,但越来越多的研究表明,lncRNA 不仅参与多种生物学进程及扮演多种角色(如剪接、转录干扰、转录后调控、基因组印迹、染色质修饰、细胞周期调控、表观遗传学调控、免疫监视等),而且广泛参与机体的生理和病理过程。研究证实,异常的 lncRNA 表达跟许多疾病相关,能够导致包括肿瘤在内的多种疾病,尽管具体的机制尚不清楚,但在不同的癌肿中,许多 lncRNA 扮演着双重角色,即致癌和抑癌。因此,在庞大的与癌肿相关的机制网络中,探究与癌症相关的 lncRNA 以及 lncRNA 在癌症形成、转移、肿瘤耐药中的分子生物学机制显得尤为重要,有望为肿瘤的预防和诊治提供新的策略。

2 DNA 甲基化的概述

DNA 甲基化是一种表观遗传修饰,在甲基转移酶的催化下,DNA 的 CG 两个核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基基团的化学修饰现象。DNA 的甲基化会抑制基因的表达,DNA 的甲基化对维持染色体的结构、X 染色体的失活、基因印记和肿瘤的发生发

展都起重要的作用。DNA 甲基化模式的改变,尤其是某些抑癌基因局部甲基化水平的异常增加,在肿瘤的发生和发展过程中起到了不容忽视的作用。研究发现,肿瘤细胞 DNA 存在广泛的低甲基化和局部区域的高甲基化共存现象,以及总的甲基化能力增高,这 3 个特征各以不同的机制共同参与甲基化在肿瘤发生、发展中的作用。如胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌等众多恶性肿瘤都不同程度地存在一个或多个肿瘤抑制基因 CpG 岛甲基化。

3 lncRNA 与 DNA 甲基化

表观遗传是指遗传表型和基因表达发生了可遗传的改变,而不涉及 DNA 序列的变化,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等修饰形式^[7]。近来,随着人们对 lncRNA 认识的不断加深,发现 lncRNA 的功能往往受到表观遗传作用的影响,同时 lncRNA 通过基因组印迹、剂量补偿效应、染色质修饰等过程,在基因的表达中发挥表观遗传学作用。

3.1 H19 与 DNA 甲基化

H19 基因位于人染色体 11p15.5,共有 5 个外显子及 4 个内含子,H19 基因编码一个 2.3kb 的非编码 RNA 分子,命名为 H19,H19 是第一个发现与癌症相关的 lncRNA。H19 在胚胎发育期呈高表达,主要集中表达于内胚层及中胚层来源的组织,出生后 H19 的表达降低,仅在心肌及骨骼肌中有一定的表达^[10]。H19/IGF2 印迹基因隶属于一个基因印迹群,在进化上具有高度的保守性。H19 基因为母源性印迹基因,而 IGF2 基因为父源性印迹基因,两者相距 90kb,皆受 H19 基因上游 4kb 处差异甲基化区(differentially methylated region,DMR)或印记调控区(imprinting control region,ICR)调控^[11]。

在一些肿瘤如 Wilms 肿瘤中,H19 基因的表达往往是下调的。Dao 等^[12]认为,H19 基因在这些肿瘤中表达下调,而 IGF2 基因则双等位基因表达,这与 H19 基因 DMR 双等位基因的超甲基化有关。提示 H19 基因很可能具有抑制这类肿瘤发生的作用。Juan 等^[13]也认为 H19 基因作为肿瘤抑制子发挥作用。Lustig-Yariv 等^[14]检测了绒毛膜癌细胞株中 H19 基因及 IGF2 基因的表达,认为 H19 是一个致癌基因;Ariel 等^[15]更是认为 H19 基因是人膀胱癌早期复

发的一个标志物;Matouk 等^[16]认为 H19 是人源肿瘤生长所必需的。H19 在不同肿瘤中扮演致癌与抑癌的双面角色,这种矛盾角色可能与 H19 本身的功能多样性以及组织特异性有关^[17]。

Miroglio 等^[18]首次在文中报道,散发性结直肠癌(CRC)肿瘤中,*IGF2*的 DMR0 和 DMR2 都呈现低甲基化,而 *H19* DMR 保持其单等位基因的甲基化模式。在淋巴细胞 DNA,*IGF2*的 DMR2 中连续相关的 9 个 CpG 岛呈低甲基化,但这种现象只在家族性腺瘤性息肉病的患者中发现,由此可知甲基化改变在 *IGF2* 基因发生更加广泛,而 DMR2 呈低甲基化的淋巴细胞可能是一个家族性腺瘤性息肉病的特异标志物。之后,Song 等^[19]研究证实随着结直肠癌的进展,DNA 甲基化出现异常且随之改变,这均与 DNA 甲基化转移酶 3B(DNMT3B)的表达增益相关,提示其中的因果关系。在 Cheng 等^[20]和 Tian 等^[21]的研究中,印记缺失(LOI)与 *IGF2* 的表达及 *H19* DMR 的低甲基化显示显著的相关性,*H19* DMR 低甲基化状态在 *IGF2* LOI 组明显高于印记保留(ROI)组,*H19* DMR 低甲基化通常导致 *IGF2* 的过度表达,促进肿瘤的发展及转移,同时也证明了 *IGF2* 的印记缺失在 CRC 的发生过程中的重要作用。Gao 等^[22]对 276 例食管鳞状细胞癌(ESCC)样本进行分析时,也发现了同样的现象。

肝母细胞瘤(HB)是儿童早期胚胎的肝脏肿瘤,多伴有远处转移和血管浸润,预后不良。研究显示,*IGF2*、*IGF2/H19* 区域的印迹缺失,以及多形性腺瘤基因 1(*PLAG1*)的扩增表达是 HB 的共同特征,说明 IGF 轴在肝母细胞瘤生成过程起到关键作用。Regel 在研究中,调查了胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP3)(一个已知的 IGF 轴的竞争对手)在儿科肝脏癌症的作用。结果显示,该 *IGFBP3* 基因在正常小儿的肝脏高水平表达,在 HB 细胞系和大多 HB 原发肿瘤(26/36)显著下调。对 HB 细胞系中 *IGF-BP3* 启动子区域的 CpG 结合位点的甲基化情况进行详细分析时发现 DNA 甲基化高度存在,表明这与 *IGFBP3* 的抑制相关联。对 HB 细胞系进行 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine)处理时发生 DNA 去甲基化和 *IGFBP3* 表达沉默的再活化。有趣的是,*IGFBP3* 基因启动子甲基化主要发生在伴有血管浸润的转移性 HB。在 HB 细胞中恢复 *IGFBP3* 的表达

则会削弱集落形成、迁移和侵袭的能力。此研究首次提供了直接的证据,表明 *IGFBP3* 的激活会降低儿科肝癌细胞的侵袭性,而 *IGFBP3* 启动子甲基化则可能被用作检验血管浸润的一个指标^[23]。

3.2 HOTAIR 与甲基化

HOTAIR 是第一个被发现具有反式转录调控作用的 lncRNA,定位于 12q13.13,其功能片段位于 5'端 1~300nt 和 3'端 1 500~2 146nt 区域,*HOTAIR* 不编码蛋白,而是作为一个分子支架,结合至少 2 个不同的组蛋白修饰复合物:①5'端结合多梳抑制复合体 2(polycomb re- pressive complex 2,PRC2),介导染色体组蛋白 H3K27 甲基化(histone H3 tri-methylated at lysine 27,H3K27me3);②3'端结合组蛋白赖氨酸去甲基化酶(lysine specific demethylase1,LSI1),介导染色体组蛋白 H3K4Me2 的去甲基作用 (histone H3 dimethyl Lys4,H3K4me2)。*HOTAIR* 介导这 2 种复合体结合到特异性的基因组位点,位于染色体 2 的 *HOXD* 是 PRC2 的一个靶点,与 *HOXD* 结合后使该位点上一段 40kb 的区域发生转录沉默进而促进癌的转移^[24],*HOTAIR* 已被视为一种致癌基因,其在大多数实体癌症普遍过度表达,与肿瘤侵袭、进展、转移、预后差相关。

HOTAIR 已被证实在大多数癌症生物进程中发挥关键作用,将是一个新的潜在的肿瘤治疗靶点^[25]。Gupta 等^[26]研究发现在乳腺癌中,发生上述联级反应导致乳腺上皮细胞的基因表达方式变得更类似于胚胎成纤维细胞,而且肿瘤转移能力表现出某种程度上依赖于 PRC2 而增强,针对 *HOTAIR* 进行 siRNA 干扰,能够抑制肿瘤转移,尤其是在 PRC2 过度活跃的细胞中。已有研究发现结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、肾癌与 *HOTAIR* 相关^[27-31]。

Endo 等^[32]研究发现,与正常胃组织对比,胃癌组织中 *HOTAIR* 显著高表达,而且对临床资料研究显示 *HOTAIR* 高表达与淋巴结转移、血管侵犯、生存期短成正相关性。这些研究结果与 Hajjari 等^[33]和 Xu 等^[34]的研究结果一致。但是,Endo 的实验并未显示 *HOTAIR* 表达与胃癌细胞生长存在明显关联,只是证明 *HOTAIR* 在胃癌中表达与胃癌转移相关,具体机制有待进一步研究。

Ge 等^[35]和 Li 等^[36]对 *HOTAIR* 在 ESCC 中的作用机制进行了研究,发现 *HOTAIR* 在 ESCC 中较其

邻近正常食管组织表达增高。HOTAIR 和 WIF-1 表达的负相关关系在食管癌细胞和组织中已得到证实, 而 WIF-1 在 Wnt/ β -catenin 信号通路中的发挥重要作用。HOTAIR 可以直接减少 WIF-1 的表达, 促进了组蛋白 H3K27 启动子区域甲基化, 然后激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。这种新发现的 HOTAIR/WIF-1 轴阐释了 ESCC 细胞转移的分子机制, 并为 ESCC 的治疗提供一个新的靶点。

Li 等^[37]探究了 HOTAIR 在人类喉鳞状细胞癌 (LSCC) 中的表达及功能, 研究表明, HOTAIR 在 LSCC 中的表达水平显著高于相邻非肿瘤组织, 且组织学分级较差或临床分期较高组织中都有较高的 HOTAIR 表达。Log-rank 检验显示 HOTAIR 的表达水平和喉癌患者的预后有显著的关联, 表达越高, 预后越差。多因素 Cox 分析表明, HOTAIR 是喉癌的独立预后因素。针对 HOTAIR 进行 siRNA 干扰会减弱癌细胞的侵袭性并诱导癌细胞在体外凋亡, 明显抑制喉癌细胞在裸鼠体内的生长。而且, HOTAIR 缺失造成 *PTEN* (一种已知的抑癌基因) 在癌细胞显著甲基化。可推断, HOTAIR 可以促进 *PTEN* 甲基化, 具有致癌作用。

3.3 SRHC 与 DNA 甲基化

启动子 CpG 岛的甲基化是癌细胞致使抑癌基因表达沉默的常见策略^[38]。Zheng 等^[39]通过对 29 对肝癌 lncRNA 芯片的表达分析, 发现了一个新的 lncRNA (NCBI 编号: uc003jdr) 在肝细胞癌 (HCC) 中显著降低或缺失 (命名此 lncRNA 为 SRHC), 并发现其表达与 α 甲胎蛋白 (AFP) 水平和肿瘤分化程度有关。Zheng 等在之前的研究发现, SRHC 启动子在结肠癌呈高甲基化状态, 而在配对正常组织呈非甲基化状态。为了调查在肝癌中 SRHC 的下调是否也是由 DNA 甲基化引起, Zheng 等进行了肝癌细胞 (SMMC-7721 系和 Hep3B 系) 的甲基化测序。结果表明, 该基因的启动子区域富含 CpG 岛, 在 SMMC-7721 系和 Hep3B 系呈现甲基化, 在正常肝细胞 (TMLE-3 系) 中非甲基化, 进一步对 SMMC-7721 和 Hep3B 细胞进行去甲基化的实验时, SRHC 表达明显上调。所有结果表明, SRHC 的表达下调是由 DNA 甲基化引起。

3.4 CAHM 与甲基化

CAHM 基因 (colorectal adenocarcinoma hyper-

methylated), 之前为 LOC100526820, 位于 6 号染色体上 (hg19 CHR6:163834097-163 834982), 缺少内含子, 编码一个 lncRNA, 其相邻基因为 *QKI*, *QKI* 可以编码 RNA 结合蛋白。Pedersen 等^[40]在研究中发现 *CAHM* 基因在 CRC 中出现频繁超甲基化。而对其他非 CRC 组织样本进行分析时, 发现 *CAHM* RNA 水平与 *CAHM* 甲基化百分比呈负相关, 表明 *CAHM* 基因的表达通常在 CRC 中降低。同时发现, 大肠癌患者的血液中 DNA 甲基化明显高于正常人, 且释放入血的呈现 DNA 甲基化的 *CAHM* 的量随肿瘤分级的升高而增加。*CAHM* DNA 甲基化有望成为通过血浆检测筛查 CRC 的标记。

3.5 Linc-POU3F3 与甲基化

Linc-POU3F3 (POU Class 3 Homeobox 3) 由毗邻 *POU3F3* 基因所编码, Li 等^[41]使用实时定量聚合酶链反应, 测量在 ESCC 和周围非肿瘤组织中的 26 个高度保守 lncRNAs 的表达水平, 发现 Linc-POU3F3 在 ESCC 中的表达显著高于邻近的非肿瘤组织。RNA 免疫沉淀测定显示, Linc-POU3F3 与 *EZH2* mRNA 相关。Linc-POU3F3 在细胞系过表达增加其增殖能力, 并减少 *POU3F3* mRNA 的表达, 而敲除 Linc-POU3F3 则会使 *POU3F3* mRNA 的水平增加。*POU3F3* 的 CpG 岛被密集甲基化会促使 Linc-POU3F3 在 ESCC 细胞系过度表达; 敲除 Linc-POU3F3, 这些位点的甲基化将减少。采用药物抑制 *EZH2* 时, *POU3F3* mRNA 的水平增加, DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的活性显著降低。由此得出结论, Linc-POU3F3 在食管癌患者样本中的水平与非肿瘤组织相比有所增加。这个非编码的 RNA 通过与 *EZH2* 相互作用以促进 *POU3F3* 的甲基化及 ESCC 的发展。

3.6 MEG3 与甲基化

母系印记基因 3 (maternal imprinted genes 3, *MEG3*) 是首次由 Miyoshi 等^[42]在 2000 年发现的, *MEG3* lncRNA 长约 1.6kb, 缺乏完整的开放阅读框, 由位于染色体 14q32 上的 *MEG3* 基因编码。在多种正常组织中均有表达, 在脑膜瘤、垂体瘤、结肠癌、鼻咽癌以及白血病等多种肿瘤中其表达水平降低或出现缺失, 且伴随 DNA 甲基化异常。此外, 还发现异位表达 *MEG3* 可抑制不同种类的人类癌细胞系的生长, 可能是潜在的肿瘤抑制基因^[43]。

Braconi 等^[44]的研究结果表明, microRNAa 能够抑制相关的 DNMT 进而调控 MEG3 甲基化。随后的研究中发现 MicroRNA29a 的过度表达能够上调 EGM3 在肝癌细胞中的表达, 而 MEG3 与 miRNA148a 在肝癌细胞的正相关性也得到检验, 均证实了上述观点。Sun 等^[45]研究 MEG3 基因在胃癌中的情况时, 发现 DNA 甲基化可导致 MEG3 lncRNA 不表达, 提示 DNA 甲基化可能与 MEG3 lncRNA 在胃癌中低表达/不表达相关, 通常 MEG3 lncRNA 低表达者预后不良。用 siRNA 抑制 DNMT 从而抑制 DNA 甲基化时, MEG3 表达增加, 抑制胃癌细胞生长并促进细胞凋亡。沉默 MEG3 则可促进胃癌细胞增殖^[45-47]。

4 小结与展望

表观遗传修饰影响基因的转录活性而不涉及 DNA 序列的改变, 在肿瘤形成中对基因表达的调节有重要意义。DNA 甲基化是研究最为深入的表观遗传学机制。该机制的异化可导致基因表达的异常及基因组稳定性的降低, 继而促进肿瘤的发生和发展。启动子 CpG 岛的高甲基化已被认为是与遗传性缺陷同等重要的、造成抑癌基因在肿瘤中失活的分子生物学机制。由此可以推想, 无突变或缺失, 仅出现高甲基化的生化肿瘤抑制基因如能重新表达, 细胞生长抑制功能就会得到重建。目前已知的胞嘧啶甲基化转移酶抑制剂 5-氮-2'-脱氧胞苷用于临床治疗高危骨髓增生异常综合征 (MDS) 已取得了一定疗效, 但是由于其无基因特异性, 不能选择性地活化沉默的目的基因, 从而引起整体的低甲基化, 对机体造成了不可忽视的毒副作用。虽然有关 DNA 甲基化肿瘤特异性异化谱式信息仍极有限, 但其在肿瘤临床诊断和预后中的巨大潜力已开始得到重视。

lncRNA 作为新发现的表观遗传调控形式, 在肿瘤的发生发展、侵袭转移中都发挥着重要作用。已知大部分 lncRNA 显示了不同的组织特异性和不同的亚细胞定位, 并在不同的细胞定位中起不同的作用, 尤其是在细胞核中。若是能够实现 lncRNA 水平上使因甲基化灭活的目的基因的重新活化, 人类在战胜肿瘤的道路上将会迈进重大一步。随着人们对表观遗传及 lncRNA 研究的日渐成熟, 我们越来越有

理由相信, 这将为肿瘤的预防和治疗开辟一条重要的革命化的道路。

参考文献:

- [1] Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(14):6391-6400.
- [2] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. Mol Cell, 2011, 43(6):904-914.
- [3] Novikova IV, Hennelly SP, Tung CS, et al. Rise of the RNA machines: exploring the structure of long non-coding RNAs[J]. J Mol Biol, 2013, 425(19):3731-3746.
- [4] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. Genome Res, 2012, 22(9):1775-1789.
- [5] Papait R, Kunderfranco P, Stirparo GG, et al. Long non-coding RNA: a new player of heart failure[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2013, 6(6):876-883.
- [6] Zhu S, Zhang XO, Yang L. Panning for long noncoding RNAs[J]. Biomolecules, 2013, 3(1):226-241.
- [7] Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics [J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(3):430-440.
- [8] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs[J]. Nature, 2012, 482(7385):339-346.
- [9] Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs[J]. RNA Biol, 2013, 10(6):925-933.
- [10] Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, et al. Tumour-suppressor activity of H19 RNA[J]. Nature, 1993, 365(6448):764-767.
- [11] Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2[J]. Genes Dev, 1998, 12(23):3693-3702.
- [12] Dao D, Wslsh CP, Yuan L, et al. Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7; inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(7):1337-1352.
- [13] Juan V, Crain C, Wilson C. Evidence for evolutionarily conserved Secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(5):1221-1227.
- [14] Lustig-Yariv O, Schulze E, Komitowski D, et al. The expression of the imprinted genes H19 and IGF2 in choriocarcinoma cell lines. Is H19 a tumor suppressor gene? [J]. Oncogene, 1997, 15(2):176-177.
- [15] Ariel I, Sughayer M, Fellig Y, et al. The imprinted H19 gene is a marker of early recurrence in human bladder carcinoma[J]. Mol Pathol, 2000, 53(6):320-323.
- [16] Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth [J]. PloS One, 2007, 2(9):E845.
- [17] Gabory A, Ripoche MA, Yoshimizu T, et al. The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA[J]. Cytogenet Genome Res, 2006, 113(1-4):188-193.

- [18] Miroglio A, Jammes H, Tost J, et al. Specific hypomethylated CpGs at the IGF2 locus act as an epigenetic biomarker for familial adenomatous polyposis colorectal cancer [J]. *Epigenomics*, 2010, 2(3): 365–375.
- [19] Song JY, Lee JH, Joe CO, et al. Retrotransposon-specific DNA hypomethylation and two-step loss-of-imprinting during WW45 haploinsufficiency-induced hepatocarcinogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(2): 728–734.
- [20] Cheng YW, Idrees K, Shattock R, et al. Loss of imprinting and marked gene elevation are 2 forms of aberrant IGF2 expression in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 568–577.
- [21] Tian F, Tang Z, Song G, et al. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypomethylation of the H19 differentially methylated region in the tumor tissue of colorectal cancer patients [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(6): 1536–1540.
- [22] 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.
- [23] Regel I, Eichenmüller M, Joppien S, et al. IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11: 9.
- [24] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1311–1323.
- [25] Wu Y, Zhang L, Wang Y, et al. Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9531–9538.
- [26] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071–1076.
- [27] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(20): 6320–6326.
- [28] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1616–1625.
- [29] Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2): 319–324.
- [30] Nie Y, Liu X, Qu S, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(4): 458–464.
- [31] Wu Y, Liu J, Zheng Y, et al. Suppressed expression of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and tumorigenicity of renal carcinoma cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12): 11887–11894.
- [32] Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, et al. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77070.
- [33] Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, et al. Up-regulation of HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(3): 670.
- [34] Xu ZY, Yu QM, Du YA, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(6): 587–597.
- [35] Ge XS, Ma HJ, Zheng XH, 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.
- [36] Li X, Wu Z, Mei Q, et al. Long non-coding RNA HOTAIR, a driver of malignancy, predicts negative prognosis and exhibits oncogenic activity in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(8): 2266–2278.
- [37] Li D, Feng J, Wu T, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(1): 64–70.
- [38] Xu Y, Hu B, Choi AJ, et al. Unique DNA methylome profiles in CpG island methylator phenotype colon cancers [J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 283–291.
- [39] Zheng H, Yang S, Yang Y, et al. Epigenetically silenced long noncoding-SRHC promotes proliferation of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 16(5): 728–736.
- [40] Pedersen SK, Mitchell SM, Graham LD, et al. CAHM, a long non-coding RNA gene hypermethylated in colorectal neoplasia [J]. *Epigenetics*, 2014, 9(8): 1071–1082.
- [41] Li W, Zheng J, Deng J, et al. Increased levels of the long intergenic non-protein coding RNA POU3F3 promote DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1714–1726.
- [42] Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, et al. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q [J]. *Genes Cells*, 2000, 5(3): 211–220.
- [43] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(3): R45–R53.
- [44] Braconi C, Kogwre 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.
- [45] 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*, 2014, 35(2): 1065–1073.
- [46] Sheng X, Li J, Yang L, et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 277–285.
- [47] Yan J, Guo X, Xia J, et al. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1 [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 879.