

长链非编码 RNA MEG3、HOTAIR 和 MALAT-1 在垂体腺瘤中的表达水平及其与肿瘤侵袭的关系

张婷 徐裕 薛鑫诚 何佳 高恒 王其平

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA MEG3、HOTAIR 和 MALAT-1 对垂体腺瘤发生发展和侵袭的作用。**方法** 应用实时定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 MEG3、HOTAIR、MALAT-1 在正常脑组织、非侵袭性和侵袭性垂体腺瘤中的表达情况,并分析 3 组之间的表达水平差异。**结果** MEG3 表达水平在正常脑组织、非侵袭性垂体腺瘤和侵袭性垂体腺瘤中逐渐降低,而 HOTAIR 表达水平逐渐升高($P < 0.05$)。MALAT-1 的表达水平在 3 组样本之间没有统计学差异($P > 0.05$)。MEG3 的表达水平与垂体腺瘤侵袭性生物学行为有相关($P < 0.05$),HOTAIR 的表达水平与侵袭性生物学行为和肿瘤大小有关($P < 0.05$),而 MALAT-1 的表达水平与年龄、性别、分类、生物学行为和肿瘤大小之间没有显著关系($P > 0.05$)。**结论** MEG3 和 HOTAIR 的表达水平异常可能与垂体腺瘤的发展和侵袭密切相关。

【关键词】 垂体腺瘤 长链非编码 RNA MEG3 HOTAIR MALAT-1 侵袭

【中图分类号】 R736.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)02-0209-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.02.019

The expression levels of long non-coding RNA MEG3, HOTAIR and MALAT-1 in pituitary adenomas and its relationship with tumor invasion Zhang Ting*, Xu Yu, Xue Xincheng, et al. * Central Laboratory, the Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast University Medical College, Jiangyin Jiangsu 214400

【Abstract】 Objective To study the roles of long non-coding RNA MEG3, HOTAIR and MALAT-1 in the development and invasion of pituitary adenomas. **Methods** Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of MEG3, HOTAIR and MALAT-1 in normal brain tissues, non-invasive and invasive pituitary adenomas, and the expression level differences were analyzed among them. **Results** The expression level of MEG3 was gradually decreased from normal brain tissues to non-invasive pituitary adenomas, from non-invasive pituitary adenomas to invasive pituitary adenomas, while HOTAIR lncRNA levels were gradually increased with statistically significant difference ($P < 0.05$). The expression level of MALAT-1 was not statistically different among the three groups ($P > 0.05$). There was a significant association between expression level of MEG3 and biological behavior of tumor invasion ($P < 0.05$). The expression level of HOTAIR was correlated with invasive biological behavior and tumor size ($P < 0.05$), but there was no significant correlation between the expression level of MALAT-1 and age, sex, classification, biological behavior and tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion** The abnormal expression levels of MEG3 and HOTAIR might be closely related to the development and invasion of pituitary adenomas.

【Key words】 Pituitary adenomas lncRNA MEG3 HOTAIR MALAT-1 Invasion

垂体腺瘤(PA)约占原发性颅内肿瘤的 15%,每 10 万人中有 80~90 例发生 PA^[1-2]。许多垂体腺瘤分泌垂体激素导致血液激素水平升高和临床综合

征。尽管大多数垂体腺瘤在组织学上是良性的,但它们经常侵入周围的结构。迄今为止施行创伤性的根治性手术依然比较困难,并且容易复发。此外,对于垂体腺瘤没有有效的药物,放疗仍然存在争议。因此,垂体腺瘤的治疗对于临床医生来说是 1 个挑战。关于垂体腺瘤侵袭性生物学行为的机制还有待于深入研究。长链非编码 RNA(lncRNA)是内源转录的 RNA 分子,在基因组中被普遍转录,缺乏蛋白

基金项目:无锡市卫生计生委项目(MS201641);江阴市卫生局科研立项(Z201401)

作者单位:210400 江苏省江阴市东南大学医学院附属江阴医院中心实验室(张婷),神经外科[徐裕 薛鑫诚 何佳 高恒 王其平(通信作者)]

质编码能力^[3]。越来越多的研究显示 lncRNA 通过不同的机制参与不同的生物学过程。许多 lncRNA 表达水平的改变可能在肿瘤发生发展中发挥重要作用例如 HOTAIR(HOX transcript antisense RNA)和 MALAT-1(metastasis-associated lung adenocarcinomatranscript-1)^[4-7]。但是关于这些 lncRNA 在垂体腺瘤中的作用研究较少。母系表达基因 3 (MEG3, maternally expressed gene 3)是 1 个肿瘤抑制基因,在许多正常人体组织中表达,在脑和垂体中表达水平最高^[8]。本研究通过检测正常脑组织以及侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤中 lncRNA MEG3, HOTAIR 和 MALAT-1 的表达水平,以探讨它们在垂体腺瘤发生发展和侵袭中的作用。

1 材料与方法

1.1 患者和标本

收集 2015 年 1 月 - 2017 年 12 月在东南大学医学院附属江阴医院诊断为垂体腺瘤的 33 例患者进行分析。所有患者均接受鼻内镜手术治疗切除垂体腺瘤。根据临床表现、激素类型和磁共振成像(MRI)表现以及所有垂体激素的组织病理学分析和免疫组织化学染色证实垂体腺瘤的诊断。本研究涉及的患者不包括之前有过放疗或复发的患者。从 5 例脑外伤患者中取正常脑组织。侵袭性垂体腺瘤定义为 Hardy-Wilson 分级Ⅳ级和/或 Knosp 分级Ⅲ级和Ⅳ级(图 1)。江阴市人民医院伦理委员会批准本研究,并获得所有患者的知情同意。

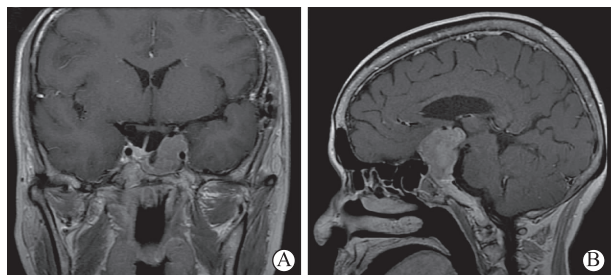


图 1 侵袭性垂体腺瘤 A 为垂体腺瘤随着侵入第三脑室而向鞍上区域生长(Hardy-Wilson 分级Ⅳ级);B 为垂体腺瘤侵犯左侧海绵窦以包围颈动脉海绵窦段(Knosp 分级Ⅳ级)

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

垂体腺瘤和正常人脑组织在术后 30 min 内储存在液氮中;根据产品说明使用 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)从冻存肿瘤样品和正常脑组织中提取总 RNA;使用 Nano-Drop 1000(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)测定 RNA 纯度和浓度;采用第一链 cDNA 合成试剂盒(Takara)从总 RNA(5μg)合成 cDNA。

1.3 实时定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)

使用 BioRad CFX-96 系统和 SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒(Takara),根据说明书进行 qRT-PCR;建立 25 μL 反应体系,扩增条件为 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 2 min 以及 95 ℃ 15 s 和 60 ℃ 30 s, 40 个循环;以 GAPDH 作为内参;相对 mRNA 水平基于 CT 值(相对于 GAPDH 的表达水平)根据以下公式: $2^{-\Delta CT}$ [$\Delta CT = CT(\text{基因}) - CT(\text{GAPDH})$] 进行计算;mRNA 相对表达水平的计算以 CT 值为参照(经 GAPDH mRNA 表达水平校正);lncRNA 低表达定义为 lncRNA 表达水平低于中位数, lncRNA 高表达定义为 lncRNA 表达水平高于中位数;用于 RT-PCR 的引物序列见表 1。

1.4 统计学处理

使用 SPSSv16.0 软件;计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;组间差异采用独立样本 *t* 检验;用卡方检验比较 lncRNA 的表达与垂体腺瘤临床病理特征之间的关系;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床特征

本研究纳入 33 例垂体腺瘤患者,其中男 22 例,女 11 例,平均年龄(51 ± ?)岁(26~71 岁)。27 例垂体腺瘤的激素表达阴性,3 例垂体腺瘤阳性表达泌乳素(PRL),2 例垂体腺瘤阳性表达生长激素(GH),1 例阳性表达促甲状腺激素生成激素(TSH)。对激素表达染色阳性的垂体腺瘤定义为功能型垂体腺瘤,而那些对激素表达阴性的被认为是无功能垂体腺瘤(NFPA)。有 17 例侵袭性垂体

表 1 引物序列

基因名称	正向引物(5' - 3')	反向引物(5' - 3')
MEG3	ATCATCCGTCCACCTCCTTGCTCTC	GTATGAGCATAGCAAAGGTCAGGGC
HOTAIR	GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC	ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC
MALAT-1	AAAGCAAGGTCTCCCCACAAG	GGTCTGTGCTAGATCAAAAGCA
GAPDH	GAAGGTCGGAGTCAACGGATT	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT

腺瘤和 16 例非侵袭性垂体腺瘤。平均最大肿瘤直径为 (3.7 ± 1.4) cm。脑外伤患者由 3 例男性和 2 例女性组成,年龄 28~54 岁。

2.2 MEG3 在垂体腺瘤和正常脑组织中的表达水平

侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤中 MEG3 表达水平为 (0.108 ± 0.026) 、 (0.354 ± 0.126) ,显著低于正常脑组织中 MEG3 的表达水平 (1.000 ± 0.429) ,3 组间两两比较均有明显差异(正常组 vs 非侵袭组 $t = 3.290$ 、 $P = 0.030$,正常组 vs 侵袭组 $t = 4.626$ 、 $P = 0.009$,侵袭组 vs 非侵袭组 $t = 5.755$ 、 $P = 0.0001$)(图 2)。

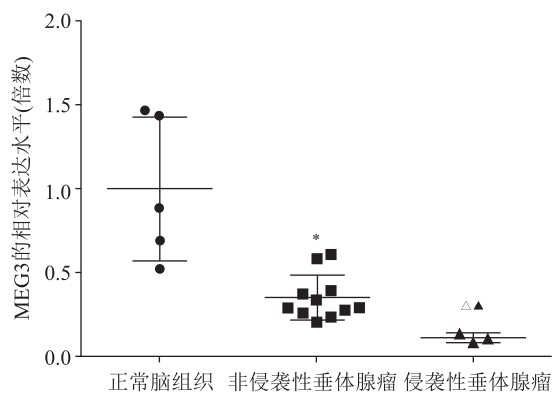


图 2 MEG3 在不同垂体腺瘤组织中的表达水平 与正常脑组织比较,* $P = 0.030$, $\Delta P = 0.009$;与非侵袭性垂体腺瘤比较,▲ $P = 0.0001$

2.3 HOTAIR 在垂体腺瘤和正常脑组织中的表达水平

侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤中 HOTAIR 表达水平为 (3.465 ± 1.665) 、 (1.918 ± 0.561) ,显著高于正常脑组织中 HOTAIR 的表达水平 (1.000 ± 0.170) ,3 组间两两比较均有明显差异(正常组 vs 非侵袭组 $t = 3.056$ 、 $P = 0.007$,正常组 vs 侵袭组 $t = 5.997$ 、 $P = 0.000$,侵袭组 vs 非侵袭组 $t = 3.110$ 、 $P = 0.004$)(图 3)。

2.4 MALAT-1 在垂体腺瘤和正常脑组织中的表达水平

侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤中 MALAT-1 表达水平为 (0.934 ± 0.360) 、 (0.957 ± 0.266) ,在正常脑组织中的表达水平 (1.000 ± 0.157) ,3 组间两两比较均无明显差异(正常组 vs 非侵袭组 $t = 0.446$ 、 $P = 0.664$,正常组 vs 侵袭组 $t = 0.591$ 、 $P = 0.563$,侵袭组 vs 非侵袭组 $t = 0.210$ 、 $P = 0.835$)(图 4)。

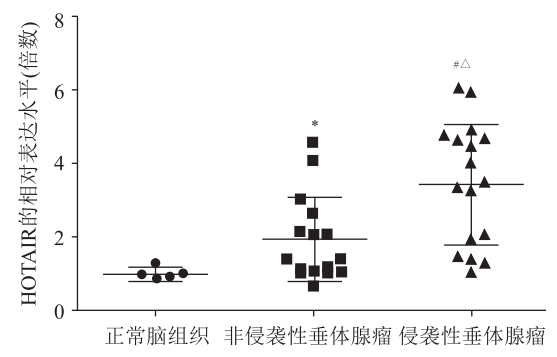


图 3 HOTAIR 在不同垂体腺瘤组织中的表达水平 与正常脑组织比较,* $P = 0.007$, $\Delta P < 0.001$;与非侵袭性垂体腺瘤比较,# $P = 0.004$

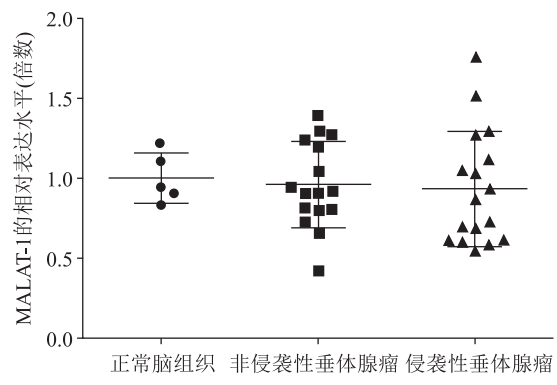


图 4 MALAT-1 在不同垂体腺瘤组织中的表达水平

2.5 lncRNA 的表达与垂体腺瘤患者临床特征的关系

为了评价 lncRNAs MEG3、HOTAIR 和 MALAT-1 的表达水平在垂体腺瘤中的临床意义,本研究采用卡方检验比较 3 种 lncRNAs 的表达水平与患者的临床病理特征(年龄、性别、分类、生物学行为、肿瘤直径)之间的关系。本研究定义低 HOTAIR 或 MALAT-1 表达为低于所有患者的第五百分位的值,而在第五十个百分位以上的值被归类为高表达。根据表达情况将 MEG3 分为无表达组和有表达组,发现 MEG3 的表达水平与垂体腺瘤侵袭性生物学行为有关;将 HOTAIR 或 MALAT-1 分为高表达组和低表达组,发现 HOTAIR 的表达水平与侵袭性生物学行为和肿瘤大小有关。然而,MALAT-1 的表达水平与年龄、性别、分类、生物学行为和肿瘤大小之间没有显著关系(表 2)。

3 讨论

许多研究显示 MEG3 作为肿瘤抑制基因发挥作用,MEG3 的表达缺失有助于肿瘤的形成和发展。在各种人类肿瘤中包括垂体腺瘤、胃癌、肺癌等

表 2 lncRNA 的表达与垂体腺瘤患者临床特征的关系[例(%)]

临床特征	MEG3		χ^2	P	HOTAIR		χ^2	P	MALAT-1		χ^2	P
	无表达	有表达			无表达	有表达			无表达	有表达		
年龄												
<50 岁	9(69. 2)	4(30. 8)	1. 193	0. 275	7(53. 8)	6(46. 2)	0. 609	0. 435	7(53. 8)	6(46. 2)	0. 122	0. 727
≥50 岁	10(50. 0)	10(50. 0)			8(40. 0)	12(60. 0)			12(60. 0)	8(40. 0)		
性别												
男	11(55. 0)	9(45. 0)	0. 138	0. 710	9(45. 0)	11(55. 0)	0. 004	0. 948	12(60. 0)	8(40. 0)	0. 122	0. 727
女	8(61. 5)	5(38. 5)			6(46. 2)	7(53. 8)			7(53. 8)	6(46. 2)		
分类												
功能型 PA	3(50. 0)	3(50. 0)	0. 172	0. 618	2(33. 3)	4(66. 7)	0. 435	0. 510	3(50. 0)	3(50. 0)	0. 172	0. 678
NFPA	16(59. 3)	11(40. 7)			13(48. 1)	14(51. 9)			16(59. 3)	11(40. 7)		
生物学行为												
侵袭	14(82. 4)	3(17. 6)	8. 812	0. 003	11(64. 7)	6(35. 3)	0. 241	0. 022	9(52. 9)	8(47. 1)	0. 308	0. 579
非侵袭	5(31. 3)	11(68. 7)			4(25. 0)	12(75. 0)			10(62. 5)	6(37. 5)		
肿瘤直径												
<3 cm	10(55. 6)	8(44. 4)	0. 066	0. 797	12(66. 7)	6(33. 3)	7. 187	0. 007	8(44. 4)	10(55. 6)	2. 975	0. 095
≥3 cm	9(60. 0)	6(40. 0)			3(20. 0)	12(80. 0)			11(73. 3)	4(26. 7)		

均观察到 MEG3 表达的缺失^[8-11]。本研究也发现 MEG3 在垂体腺瘤中表达存在缺失。此外,与非侵袭性垂体腺瘤比较,侵袭性垂体腺瘤中 MEG3 表达缺失的比例更大。前期有研究发现 MEG3 在无功能型垂体腺瘤中表达缺失^[8],本研究也发现 27 例 NFPA 中有 16 例 MEG3 表达缺失。此外,MEG3 仅在垂体腺瘤中特异性表达缺失,这些表明 MEG3 可能在垂体腺瘤的发生发展中发挥重要作用。

MEG3 启动子区的高甲基化与垂体腺瘤中 MEG3 基因表达缺失相关,基因间差异甲基化区域(IG-DMR)高甲基化可能是垂体腺瘤中 MEG3 基因沉默的另外 1 个机制^[8]。构建 MEG3 表达载体进行转染显著增加肿瘤细胞 p53 蛋白的表达水平。一些研究者还发现 MEG3 可以在 p53 不存在的情况下抑制细胞增殖^[12]。这些发现表明 MEG3 作为肿瘤抑制因子,其作用可能是由 p53 依赖性和非依赖性途径介导的^[12-13]。HOTAIR 是为数不多的经过深入研究的 lncRNA,HOTAIR 与聚梳抑制蛋白复合物 2(PRC2)相互作用,增强 H3K27 的甲基化从而降低许多基因的表达^[14]。HOTAIR 表达的增加与结肠癌和头颈部鳞癌患者的肿瘤发展和侵袭相关^[14-15]。本研究发现 HOTAIR lncRNA 水平在正常脑组织、非侵袭性垂体腺瘤和侵袭性垂体腺瘤中表达逐步增加,这意味着 HOTAIR 表达上调有助于垂体腺瘤的发生发展和侵袭,但仍然需要进一步的研究来证实本研究的猜想。MALAT-1 在多种人类肿瘤中过度表达包括卵巢癌、非小细胞肺癌和乳腺癌^[6,16-17]。MALAT-1 可以通过调控与细胞侵袭性相关的金属蛋白酶家族(MMP)基因的表达,从而影响卵巢癌细胞的侵袭^[17]。然而本研究发现在正

常垂体组织、侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤中 MALAT-1 lncRNA 水平没有显著差异。此外,MALAT-1 表达水平与患者临床病理特征之间也没有发现显著的关系。

综上所述,本研究揭示了 MEG3 在侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤之间的差异表达。MEG3 表达的缺失可能对抗肿瘤应答产生了一定的抑制作用。此外,HOTAIR 表达的增加与垂体腺瘤的发生发展和侵袭有关。MEG3 和 HOTAIR 有望成为垂体腺瘤治疗的靶标分子。由于侵袭性垂体腺瘤患者的预后较差,对于具有较高风险从垂体腺瘤患者发展为侵袭性垂体腺瘤患者的预测就显得特别重要。本研究结果表明,lncRNA MEG3 和 HOTAIR 可能是侵袭性垂体腺瘤的潜在诊断标志物。

参 考 文 献

[1] Langlois F, Lim D, Yedinak CG, et al. Predictors of silent corticotroph adenoma recurrence; a large retrospective single center study and systematic literature review[J]. Pituitary, 2018, 21(1):32-40.

[2] Lobatto DJ, De Vries F, Najafabadi A, et al. Preoperative risk factors for postoperative complications in endoscopic pituitary surgery: a systematic review[J]. Pituitary, 2018, 21(1):84-97.

[3] Lin Chun-ru, Yang Liu-qing. Long noncoding RNA in cancer: wiring signaling circuitry[J]. Trends in Cell Biology, 2018, 28(4):287-301.

[4] Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function[J]. Genome Biology, 2017, 18(1):206.

[5] Sun W, Yang Y, Xu C, et al. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers[J]. Cancer Genet, 2017, 216-217:105-110.

[6] Bai Lin, Wang Ai-hua, Zhang Ya-li, et al. Knockdown of MALAT1 enhances chemosensitivity of ovarian cancer cells to cispl-

- atin through inhibiting the Notch1 signaling pathway[J]. Experimental Cell Research,2018,366(2):161-171.
- [7] Deng J, Yang M, Jiang R, et al. Long Non-CodingRNAHOTAIRRegulates the proliferation,Self-Renewal capacity,tumor formation and migration of theCancerStem-Like cell(CSC)sub-population enriched from breast CancerCells[J]. PLOS One, 2017,12(1):e0170860.
- [8] Chunharojrith P, Nakayama Y, Jiang Xiaobing, et al. Tumor suppression by MEG3 lncRNA in a human pituitary tumor derived cell line[J]. Molecular and Cellular Endocrinology,2015, 416:27-35.
- [9] Sun Ming,Xia Rui,Jin Feiyan,et al. Downregulated long non-coding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer[J]. Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine,2014,35(2):1065-1073.
- [10] Galani V,Lampri E,Varouktsi A,et al. Genetic and epigenetic alterations in meningiomas[J]. Clinical Neurology and Neurosurgery,2017,158:119-125.
- [11] Terashima M,Tange S,Ishimura A,et al. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of Epithelial-Mesenchymal transition in lung cancer cell lines[J]. Journal of Biological Chemistry,2017,292(1):82-99.
- [12] Wei G-h, Wang X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway[J]. Europe-an Review for Medical and Pharmacological Sciences,2017,21 (17):3850-3856.
- [13] Zhan Ren-ya,Xu Kang-li,Pan Jian-wei,et al. Long noncoding RNA MEG3 mediated angiogenesis after cerebral infarction through regulating p53/NOX4 axis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2017,490(3):700-706.
- [14] Zhang Yan,Cheng Xiao-ling,Liang Hua,et al. Long non-coding RNA HOTAIR and STAT3 synergistically regulate the cervical cancer cell migration and invasion[J]. Chemico-Biological Interactions,2018,286(286):106-110.
- [15] Xiao Z,Qu Z,Chen Z,et al. lncRNA HOTAIR is a Prognostic Biomarker for the Proliferation and Chemoresistance of Colorectal Cancer via MiR-203a-3p-Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry,2018, 46(3):1275-1285.
- [16] Zhang Xiao-qiang,He Xian-ju,Liu Yun-bing,et al. MiR-101-3p inhibits the growth and metastasis of non-small cell lung cancer through blocking PI3K/AKT signal pathway by targeting MALAT-1 [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 93: 1065-1073.
- [17] Zeng Ling-huan, Cen Ying, Chen Jun-jie. Long non-coding RNA MALAT-1 contributes to maintenance of stem cell-like phenotypes in breast cancer cells[J]. Oncology Letters,2018, 15(2,B):2117-2122.