

lncRNA MEG3 表达水平及甲基化状态与垂体腺瘤术后复发的关系

罗志华 张严国 黄从刚 王春燕 李乾锋

【摘要】目的 探讨长链非编码核糖核酸(lncRNA)MEG3 表达水平及甲基化状态与垂体腺瘤术后复发的关系。**方法** 回顾性分析 2015 年 1 月~2017 年 12 月手术治疗的 75 例垂体腺瘤的临床资料。另外取 10 例颅脑损伤内减压术中切除正常脑组织为对照组。采用 qRT-PCR 法和甲基化特异性聚合酶链反应检测垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 表达和甲基化状态。垂体腺瘤病人随访至 2020 年 8 月,主要研究终点为术后复发。**结果** 垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 相对表达量明显低于正常脑组织($P<0.05$),同时其基因甲基化率明显高于正常脑组织($P<0.05$)。随访期间,19 例复发,复发率为 25.33%。与未复发组相比,复发组 lncRNA MEG3 相对表达量明显降低($P<0.05$),同时其基因启动子甲基化率明显升高($P<0.05$)。多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,lncRNA MEG3 相对表达水平降低、启动子甲基化率增高是垂体腺瘤术后复发的独立影响因素($P<0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示,lncRNA MEG3 低表达组术后复发时间(中位数为 17.0 个月)较高表达组(中位数为 24.0 个月)明显缩短($P<0.001$);MEG3 基因甲基化组术后复发时间(中位数为 17.0 个月)较非甲基化组(中位数为 60.0 个月)明显缩短($P<0.05$)。**结论** 与正常脑组织相比,垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 呈低表达,其启动子甲基化率较高,与术后复发密切相关。

【关键词】 垂体腺瘤;长链非编码核糖核酸;lncRNA MEG3;启动子甲基化;术后复发;危险因素

【文章编号】 1009-153X(2020)12-0825-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Relationship between expression level and methylation status of lncRNA MEG3 and postoperative recurrence of pituitary adenoma

LUO Zhi-hua, ZHANG Yan-guo, HUANG Cong-gang, WANG Chun-yan, LI Qian-feng. Department of Neurosurgery, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430010, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between the expression level and methylation status of lncRNA MEG3 and the postoperative recurrence of pituitary adenomas (PA). **Methods** The clinical data of 75 PA patients who underwent surgical resection in our hospital from January 2015 to December 2017 were retrospectively analyzed. The normal brain tissues obtained from 10 patients with traumatic brain injury underwent decompression were served as the control group. The expression level and methylation status of MEG3 were detected by qRT-PCR and MSP, respectively. PA patients were followed up until August 2020, and the main endpoint was postoperative recurrence. **Results** The relative expression level of MEG3 in PA tissues was significantly lower than that in normal pituitary tissues ($P<0.05$), while the methylation rate of MEG3 in PA tissues was significantly higher than that in normal pituitary tissues ($P<0.05$). During the follow-up period, there were 19 PA patients recurred. Compared with PA tissues without recurrence, the relative expression levels of MEG3 were significantly lower and the methylation rate of MEG3 gene promoter was significantly higher in PA patients with recurrence ($P<0.05$). Multivariate Cox proportional regression risk model analysis showed that the high methylation rate of MEG3 gene (HR=11.835, $P=0.002$) and the low relative expression level of MEG3 (HR=0.160, $P=0.015$) were independent risk factors for postoperative recurrence of PA. The Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the median postoperative recurrence time was significantly shorter with low MEG3 expression and high methylation than those without ($P=0.010$). **Conclusion** The expression level of lncRNA MEG3 is low and the methylation rate of MEG3 gene promoter is high in PA tissues, which is correlated to the postoperative recurrence of PA.

【Key words】 Pituitary adenomas; lncRNA MEG3; Gene methylation; Postoperative recurrence

垂体腺瘤属于颅内良性肿瘤,但也具有恶性肿

瘤的某些生物学特征,而且完全切除率低,因此术后复发率较高^[1]。复发性垂体腺瘤的发病机制复杂。近年来,研究发现长链非编码核糖核酸(long non-coding RNA, lncRNA)在肿瘤的发生、发展过程中具有重要作用^[2]。Zhang 等^[3]研究发现 lncRNA MEG3 是垂体腺瘤一个潜在的抑制因子。本文探讨 lncRNA

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.12.003
作者单位:430010,武汉市第一医院神经外科(罗志华、张严国、黄从刚、王春燕、李乾锋)
通讯作者:张严国, E-mail:linwei_buju_2003@163.com

MEG3 表达水平及甲基化状态与垂体腺瘤术后复发的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月经蝶入路显微手术切除的 75 例垂体腺瘤组织,其中男 27 例,女 48 例;年龄 18~67 岁,平均 (46.27 ± 12.33) 岁。功能性垂体腺瘤 46 例,其中生长激素腺瘤 30 例,泌乳素腺瘤 16 例;无功能性垂体腺瘤 29 例。排除术前 3 个月有溴隐亭或其他生长激素抑制剂治疗史、合并其他恶性肿瘤、内分泌系统疾病或心、肝、肾功能严重不全病人。另外取 10 例颅脑损伤内减压术中切除正常脑组织为对照组,其中男 3 例,女 7 例;年龄 34~62 岁,平均 (47.80 ± 9.64) 岁。两组年龄、性别无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 qRT-PCR 检测 lncRNA MEG3 取 100 mg 组织研磨成粉。用 Trizol 试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司)提取组织总 RNA。使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒(日本 Takara 公司)逆转录合成 cDNA。GAPDH 作为内参。采用 One Step SYBR PrimeScript™ PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)配制 PCR 反应体系: 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, 40 个循环(95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火和延伸 1 min)。重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量。MEG3 引物序列(正向 5'-AGGGGCACTAGGTAGACAGG-3', 正向 5'-CGGGTCTCTACTCAAGGGGA-3', 产物大小 285 bp)委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 MSP 法检测组织 lncRNA MEG3 基因甲基化状态 取 100 mg 组织,用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取 DNA。使用 EZ DNA 甲基化试剂盒(美国 Zymo-Research 公司)进行亚硫酸氢盐处理。PCR 条件: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 64.6 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 72 ℃ 7 min。用溴化乙锭染色在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,如果出现甲基化引物扩增条带,则判定为甲基化。每个样品进行 3 次反应。甲基化引物序列: 正向 5'-AGAGGGAATAGTTTTGAGATTTTT C-3', 反向 5'-AAAATCAACTAACGTACCTCTATACGC-3' (产物大小 120 bp)。非甲基化引物序列: 正向 5'-GAGGGAATAGTTTTGAGATTTTTTG-3', 反向 5'-AAAATCAACTACATACCTCTATACACC-3' (产物大小 119 bp)。

1.4 随访 随访截止至 2020 年 8 月。主要研究终点为术后复发(按月计),即从手术次日至随访截止时

间或确诊复发的时间。根据《中国复发性垂体腺瘤诊治专家共识(2019)》^[4]确定术后复发。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件处理;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,采用 log-rank 检验;采用多因素 Cox 比例回归风险模型分析影响术后复发的危险因素;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 表达和甲基化状态 垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 相对表达量 (0.69 ± 0.23) 明显低于正常脑组织 $(1.00 \pm 0.18; P < 0.05)$ 。垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 基因启动子甲基化率(77.33%, 58/75)明显高于正常脑组织(20.0%, 2/10; $P < 0.05$)。无功能性垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 相对表达量 (0.54 ± 0.18) 明显低于生长激素腺瘤 $(0.79 \pm 0.23; P < 0.05)$ 和泌乳素腺瘤 $(0.78 \pm 0.16; P < 0.05)$ 。

2.2 垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 相对表达量和甲基化状态的关系 甲基化组 lncRNA MEG3 相对表达量 (0.60 ± 0.18) 明显低于非甲基化组 $(0.99 \pm 0.09; P < 0.05)$ 。

2.3 垂体腺瘤术后随访复发情况 随访期间,共有 19 例复发,复发率为 25.33%。术后复发组 lncRNA MEG3 相对表达量 (0.44 ± 0.15) 较未复发组 (0.77 ± 0.19) 明显降低($P < 0.05$),启动子甲基化率(100.0%, 19/19)较未复发组(69.64%, 39/56)明显增高($P > 0.05$)。

2.4 垂体腺瘤术后复发的影响因素 多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,肿瘤未全切除、肿瘤侵袭、lncRNA MEG3 表达水平降低、MEG3 基因启动子甲基化为垂体腺瘤术后复发的独立危险因素($P < 0.05$; 表 1)。

2.5 lncRNA MEG3 相对表达量和甲基化状态与垂体腺瘤术后复发的关系 本文 lncRNA MEG3 相对表达量中位值为 0.68, < 0.68 为低表达组, ≥ 0.68 为高表达组。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示, lncRNA MEG3 低表达组术后复发时间(中位数为 17.0 个月)较高表达组(中位数为 24.0 个月)明显缩短($P < 0.001$)。MEG3 基因甲基化组术后复发时间(中位数为 17.0 个月)较非甲基化组(中位数为 60.0 个月)明显缩短($P < 0.05$)。见图 1。

3 讨论

垂体腺瘤是一种常见的颅内良性肿瘤,约占颅

表 1 75 例垂体腺瘤术后复发影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析结果

危险因素	单因素		多因素	
	风险比(95%置信区间)	P 值	风险比(95%置信区间)	P 值
	0.901(0.362~2.241)	0.823		
性别(男/女)	0.941(0.379~2.390)	0.898		
术前肿瘤体积(<9 cm ³ /≥9 cm ³)	1.919(0.755~4.880)	0.171		
肿瘤切除程度(未全切除/全切除)	9.655(2.226~41.881)	<0.001	6.643(1.982~19.627)	<0.001
肿瘤侵袭(是/否)	3.512(1.904~7.981)	0.002	2.738(1.465~6.059)	0.008
肿瘤增殖(是/否)	2.619(1.615~5.264)	0.013	1.426(0.536~3.795)	0.477
病理诊断(功能性/无功能性)	1.662(0.598~4.618)	0.330		
MEG3 表达(<中位值/≥中位值)	0.081(0.019~0.352)	<0.001	0.160(0.036~0.701)	0.015
MEG3 启动子甲基化(甲基化/非甲基化)	22.363(4.548~153.975)	<0.001	11.835(1.769~84.109)	0.002

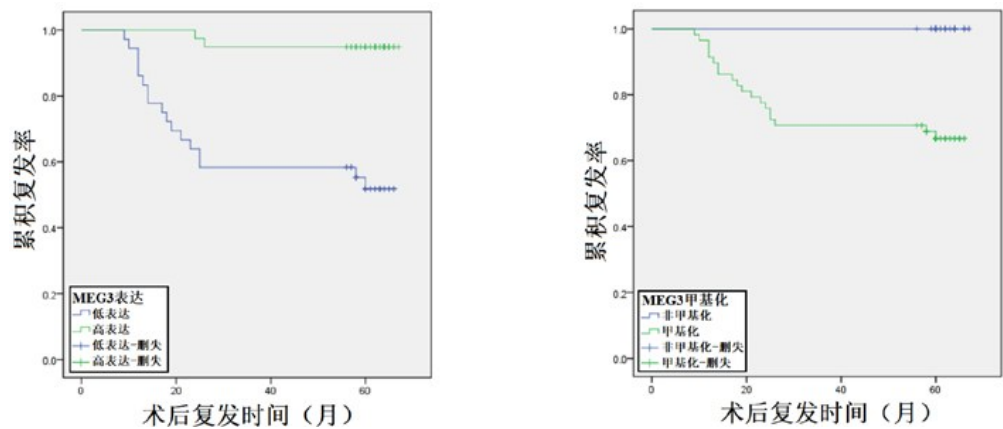


图 1 Kaplan-Meier 曲线分析 lncRNA MEG3 相对表达量和甲基化状态与垂体腺瘤术后复发的关系

内肿瘤的 10%^[5]。近年来,随着基因芯片、高通量测序、Ran Pull-down 等技术的发展,许多 lncRNA 被发现参与垂体腺瘤生物学过程。Li 等^[6]利用 RNA-seq 技术对从促性腺激素腺瘤病人和正常垂体组织中获得 lncRNAs 进行全基因组分析,其中 MEG3 是在垂体腺瘤组织中表达水平最低的基因之一。Gejman 等^[7]认为 MEG3 基因甲基化是无功能垂体腺瘤中 MEG3 表达缺失的一种表观遗传机制。本文无功能垂体腺瘤组织 lncRNA MEG3 相对表达量明显低于功能性垂体腺瘤,但是与正常脑组织相比,无论是功能性垂体腺瘤还是无功能垂体腺瘤,lncRNA MEG3 表达水平均明显降低。因此,我们推断 lncRNA MEG3 可能在控制垂体腺瘤激素分泌尤其是在临床无功能性腺瘤发病机制的特异性通路中发挥重要作用。除此以外,我们还证实,垂体腺瘤组织 MEG3 基因表达缺失可能与基因启动子甲基化有关。这与 Gejman 等^[7]的研究结论一致。此外,我们发现 MEG3 低表达可能是影响垂体腺瘤术后复发的重要独立因素,说明 MEG3 可能与肿瘤复发的某些分子通路有关,而这些通路可能是功能性腺瘤和无功能性腺瘤

复发的共同机制。Uroda 等^[8]发现 MEG3 和 p53 途径之间存在密切联系,MEG3 的表达导致 p53 蛋白的细胞聚集和 p53 下游靶基因的选择性激活。

【参考文献】

[1] 李 兵,张溢华,黄 平,等. 垂体腺瘤术后复发的危险因素分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2020, 25(7): 436-438.

[2] 王欣瑜,祁 迪,王思原,等. 长链非编码 RNA 参与肿瘤发病机制的研究进展[J]. 华北理工大学学报(医学版), 2020, 117(3): 73-78.

[3] Zhang X, Zhou YL, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(11): 5119-5126.

[4] 中国垂体腺瘤协作组,中华医学会神经外科学会. 中国复发性垂体腺瘤诊治专家共识(2019)[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(19): 1449-1453.