



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.014  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.014  
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(10):1450-1454.

· 基础研究 ·

# 母系印迹表达基因 3 在结直肠癌组织中表达及其与血管生成的关系

赵月鸣<sup>1</sup>, 邹玉凤<sup>2</sup>, 董莹<sup>3</sup>, 邢德君<sup>1</sup>

(吉林省肿瘤医院 1. 内三科 2. 病理科 3. 放疗三科, 吉林 长春 130012)

## 摘要

**目的:** 探讨结直肠癌组织中长链非编码 RNA 母系印迹表达基因 3 (MEG3) 的表达及其与肿瘤血管生成的关系。

**方法:** 用 RT-PCR 法检测 42 例结直肠癌患者癌组织与对应的癌旁组织标本, 以及人结肠癌 SW48 细胞与人正常结肠 NCM460 细胞中 MEG3 表达, 分析 MEG3 表达与患者临床病理因素的关系; 免疫组化法检测上述组织标本中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达及血管密度, 分析 VEGF 表达、血管密度与 MEG3 表达的相关性。

**结果:** MEG3 相对表达量在结直肠癌组织明显低于癌旁组织 (0.12 vs. 1.00,  $P=0.003$ ), 在 SW48 细胞中明显低于 NCM460 细胞 (0.15 vs. 1.00,  $P=0.007$ ); MEG3 的相对表达量与患者肿瘤位置、浸润深度、分化程度和淋巴结转移无明显关系 (均  $P>0.05$ )。结直肠癌组织中, VEGF 表达与血管密度均明显高于癌旁组织 (0.13 vs. 0.09; 50.34 vs. 36.57, 均  $P<0.05$ ); MEG3 表达水平和 VEGF 表达水平及血管密度均呈负相关 ( $r=-0.304$ 、 $-0.342$ , 均  $P<0.05$ )。VEGF 是 MEG3 表达水平的独立影响因素 ( $P=0.005$ )。

**结论:** 结直肠癌组织中 MEG3 表达降低, 从而可能促进肿瘤组织 VEGF 表达量与血管生成。

## 关键词

结直肠肿瘤; RNA, 长链非编码; 血管内皮生长因子类; 新生血管化, 病理性  
中图分类号: R735.3

## Expression of maternally expressed gene 3 in colorectal cancer tissue and its relation with angiogenesis

ZHAO Yueming<sup>1</sup>, ZOU Yufeng<sup>2</sup>, DONG Ying<sup>3</sup>, XING Dejun<sup>1</sup>

(1. The Third Department of Internal Medicine 2. Department of Pathology 3. The Third Department of Radiotherapy, Jilin Provincial Tumor Hospital, Changchun 130012, China)

## Abstract

**Objective:** To investigate the expression of the long non-coding RNA, maternally expressed gene 3 (MEG3), in colorectal cancer tissues and its relation with tumor angiogenesis.

**Methods:** The MEG3 expressions in specimens of tumor tissues and their adjacent normal tissues from 42 colorectal cancer patients, as well as in human colon cancer SW48 cells and normal human colon NCM460 cells were determined by RT-PCR, and the relations of MEG3 expression with clinicopathologic factors of the patients were analyzed. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular density in above

收稿日期: 2016-08-12; 修订日期: 2016-09-20。

作者简介: 赵月鸣, 吉林省肿瘤医院副主任医师, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

通信作者: 邢德君, Email: xdejun111162@sohu.com

specimens were measured by immunohistochemical staining, and the correlations of MEG3 expression with VEGF expression or vascular density were analyzed.

**Results:** The relative MEG3 expression level in colorectal cancer tissue was significantly lower than that in adjacent normal tissue (0.12 vs. 1.00,  $P=0.003$ ), and in SW48 cells was significantly lower than that in NCM460 cells (0.15 vs. 1.00,  $P=0.007$ ), and the relative MEG3 expression level showed no significant relation with tumor location, depth of invasion, degree of differentiation and lymph node metastasis of the patients (all  $P>0.05$ ). In colorectal cancer tissue, both VEGF expression and vascular density were higher than those in cancer adjacent normal tissue (0.13 vs. 0.09; 50.34 vs. 36.57, both  $P<0.05$ ); the MEG3 expression level was negatively correlated with either the VEGF expression level or vascular density ( $r=-0.304$ ;  $-0.342$ , both  $P<0.05$ ). VEGF was an independent influential factor for MEG3 level ( $P=0.005$ ).

**Conclusion:** MEG3 expression is decreased in colorectal cancer tissue, which may probably facilitate VEGF expression and tumor angiogenesis.

### Key words

Colorectal Neoplasms; RNA, Long Noncoding; Vascular Endothelial Growth Factors; Neovascularization, Pathologic

CLC number: R735.3

长链非编码RNA和肿瘤的发生发展关系密切<sup>[1-2]</sup>,长链非编码RNA的调节异常会引起多种肿瘤的发生。一些长链非编码RNA在结直肠癌中的表达异常和结直肠癌的侵袭转移以及预后有关。母系印迹表达基因3(maternally expressed gene 3, MEG3)定位于14q32.2,是第1个具有肿瘤抑制功能的长链非编码RNA,MEG3的表达下降或者缺失能够促进癌症细胞增殖,并且和VEGF相互作用调节血管的生成,影响肿瘤的发生发展<sup>[3-4]</sup>。MEG3和结直肠癌的发生也有相关性,MEG3影响结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[5-6]</sup>。本研究对结直肠癌组织中MEG3的表达进行研究,并探讨及其与血管生成的关系,为临床结直肠癌的诊断和治疗提供一定依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本与细胞

选择2014年1月—2015年12月吉林省肿瘤医院内三科42例结直肠癌患者的结直肠癌组织和对应的42例癌旁正常结直肠组织(距离结直肠组织边缘超过10 cm)进行研究。42例结直肠癌患者均经术后病理证实为结直肠癌,手术前均未进行过放化疗治疗,病史资料均完整。人结肠癌细胞SW48和人正常结肠细胞NCM460购自上海中科院细胞库。

### 1.2 方法

收集患者性别、年龄、肿瘤位置、浸润深

度、分化程度、淋巴结转移等临床病理资料。

结直肠癌组织和细胞中MEG3表达量测定:采用TRIzol法提取组织中总RNA,逆转录反应合成cDNA,进行RT-PCR反应,目的基因为MEG3,内参基因为18s rRNA。MEG3正向引物为:5'-ATG AGA GCA ACC TCC TAG GGT TGT TGT GAG-3',反向引物:5'-CCC GCC CAG GAA GAA GNA CTT GGG TCCG G-3';内参基因18s rRNA正向引物:5'-CGA CGA CCC ATT CGA ACG TCT-3',反向引物:5'-GCT ATT GGA GCT GGA ATT ACC G-3'。使用qPCR SuperMix-UGD进行PCR反应,PCR仪(Corbett Rotor Gene 3000)进行检测,反应条件为第一步:95℃ 30 s;第二步:95℃ 15 s、60℃ 30 s、70℃ 30 s,共40个循环。采集样品的Ct值,Ct值为根据内参基因标准化以后计算的相对表达量。

VEGF表达的测定:采用免疫组化法测定结直肠癌组织和癌旁正常结直肠组织中VEGF表达情况:一抗为VEGF抗体,二抗为山羊抗兔IgG,阴性对照以磷酸盐缓冲液代替一抗,VEGF阳性表达为棕黄色显色,采用图像分析系统(Image-Pro Plus6.0)进行相对定量分析。

血管密度计算:在低倍镜视野下记录管壁为VEGF阳性表达(棕黄色显色)并且内皮结构清晰、血管壁完整的血管,每个标本取5个视野求平均值。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行分析,数据采用均

数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组之间均数比较采用 *t* 检验, 多组之间均数比较采用方差分析, 相关性分析采用 Spearman 相关分析和多元线性回归分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 结直肠癌组织和正常组织中 MEG3 相对表达量比较

RT-PCR 结果显示, 结直肠癌组织中 MEG3

相对表达量低于正常结直肠组织 [ $(0.12 \pm 0.07)$  vs.  $(1.00 \pm 0.00)$ ,  $t=5.374$ ,  $P=0.003$ ]; 结直肠癌细胞 SW48 中 MEG3 相对表达量低于正常结直肠细胞 NCM460 中 MEG3 相对表达量 [ $(0.15 \pm 0.04)$  vs.  $(1.00 \pm 0.00)$ ,  $t=5.132$ ,  $P=0.007$ ] (图 1)。

### 2.2 结直肠癌组织中 MEG3 的相对表达量和结直肠癌临床病理特点的关系

分析结果显示, 结直肠癌组织中 MEG3 的相对表达量和结直肠癌的肿瘤位置、浸润深度、分化程度和淋巴结转移均无明显关系 (均  $P > 0.05$ ) (表 1)。

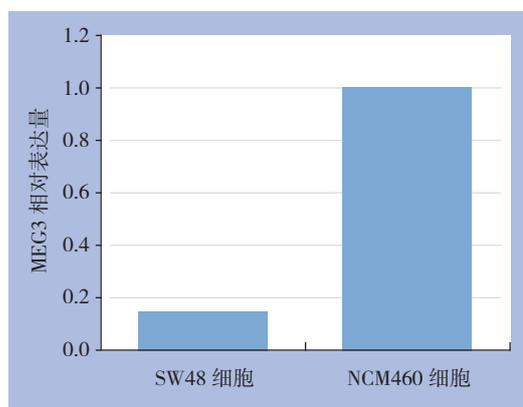
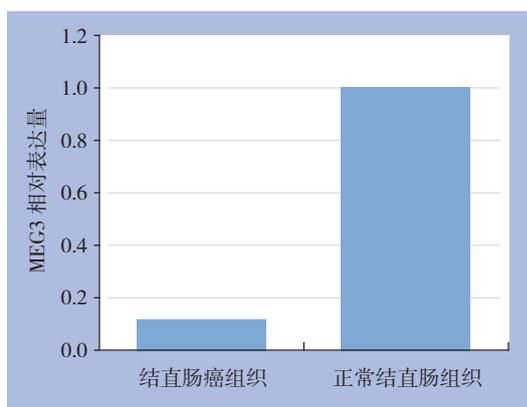


图 1 RT-PCR 检测 MEG3 相对表达量

Table 1 Relative MEG3 expression detected by RT-PCR

表 1 结直肠癌组织中 MEG3 的相对表达量和结直肠癌临床病理特点的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Relations of the relative MEG3 expression level with clinicopathologic features of colorectal cancer ( $\bar{x} \pm s$ )

因素	n	MEG3 相对表达量	t/F	P
肿瘤位置				
结肠	20	$0.11 \pm 0.06$	1.426	0.421
直肠	22	$0.16 \pm 0.09$		
浸润深度				
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	9	$0.11 \pm 0.07$	0.536	0.845
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	33	$0.13 \pm 0.05$		
分化程度				
低分化	8	$0.11 \pm 0.05$	1.032	0.687
中分化	30	$0.13 \pm 0.08$		
高分化	4	$0.12 \pm 0.09$		
淋巴结转移				
有	24	$0.10 \pm 0.02$	2.143	0.153
无	18	$0.18 \pm 0.08$		

### 2.3 结直肠癌组织和正常组织中 VEGF 表达情况

免疫组化法对 42 例结直肠癌组织和癌旁正常组织染色结果发现, VEGF 在结直肠癌组织和癌旁正常结直肠组织中均有表达, 主要位于

细胞质中, 为棕黄色, 点片状 (图 2)。结直肠癌组织和正常组织中 VEGF 表达水平和血管密度比较发现, 结直肠癌组织中 VEGF 表达和血管密度高于癌旁正常结直肠组织中 VEGF 表达和血管密度 [ $(0.13 \pm 0.08)$  vs.  $(0.09 \pm 0.06)$ ;  $(50.34 \pm 16.72)$  vs.  $(36.57 \pm 10.23)$ , 均  $P < 0.05$ ]。

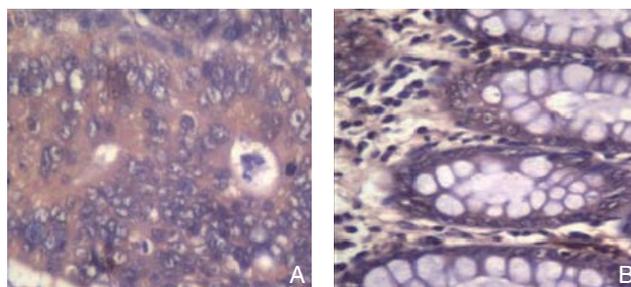


图 2 免疫组化染色 VEGF 表达情况 ( $\times 400$ ) A: 结直肠癌组织; B: 癌旁组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for VEGF expression ( $\times 400$ ) A: Colorectal cancer tissue; B: Tumor adjacent tissue

## 2.4 结直肠癌组织中 MEG3 表达水平和 VEGF 表达水平及血管密度的相关性

结直肠癌组织中 MEG3 表达水平和 VEGF 表达水平呈负相关 ( $r=-0.471$ ,  $P=0.002$ ), 和血管密

度也呈负相关 ( $r=-0.351$ ,  $P=0.023$ ) (图 3)。多元线性回归显示, VEGF 是 MEG3 水平的独立影响因素 ( $P=0.005$ ) (表 2)。

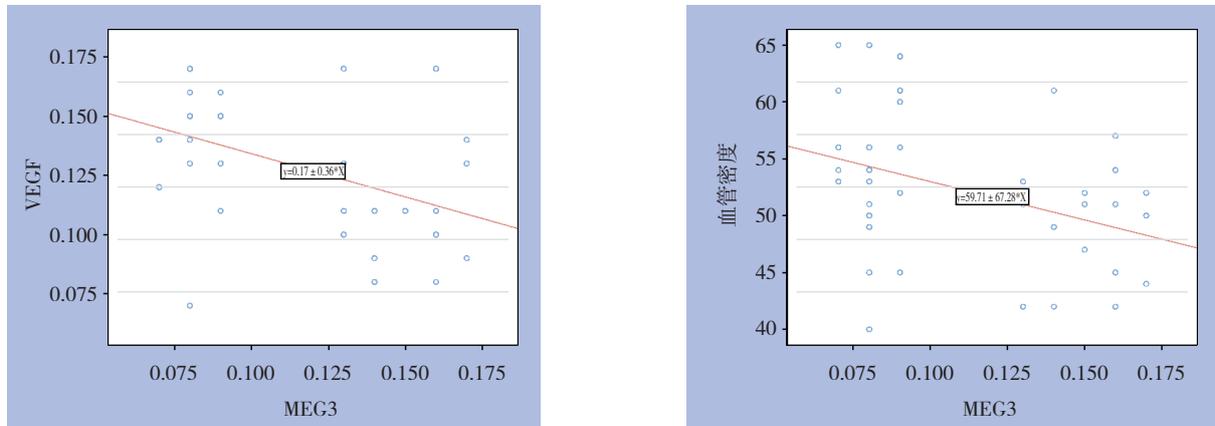


图 3 MEG3 表达与 VEGF 表达、血管密度的相关性分析

Figure 3 Analysis of correlation of MEG3 with VEGF expression and vascular density

表 2 MEG3 和 VEGF、血管密度关系的多元线性回归分析  
Table 2 Multiple linear regression analysis of the relations of MEG3 with VEGF and vascular density

因素	B	SE	Exp (B)	t	P
VEGF	-0.535	0.179	-0.415	-2.997	0.005
血管密度	-0.001	0.001	-0.263	-1.897	0.065

## 3 讨论

长链非编码 RNA 的调节异常和多种肿瘤的发生发展关系密切<sup>[7-10]</sup>。结直肠癌随着生活水平的提高, 其发病率有上升趋势, 结直肠癌的发生发展是一个多阶段、多步骤、多基因参与的疾病, 结直肠癌早期临床症状没有特异性, 多数发现已为结直肠癌晚期, 给治疗带来困难, 对结直肠癌进行早期诊断和治疗具有重要意义。

肿瘤新生血管的生成对肿瘤细胞的转移和增生起着决定性作用, 血管的生成受血管生长因子的调节, VEGF 是有效的促进血管生成因子, VEGF 能够通过促进血管内皮细胞分化、增殖以及降解血管内皮基底膜等环节促进血管生成<sup>[11]</sup>, 在肿瘤组织中, 受肿瘤细胞侵袭的肥大细胞核肿瘤细胞均能够诱导 VEGF 的表达增加, 促进血管内皮细胞的增殖形成新生血管, 为肿瘤的生长提供营养, VEGF 同时提高血管的通透性, 使血浆蛋白外渗, 为新生血管和肿瘤细胞的生长提供物质基础<sup>[12-13]</sup>。MEG3 为长链非编码 RNA, 发挥抑制肿瘤发生的作用, 在细胞中 MEG3 的过表达能够诱导细

胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖, MEG3 通过和 VEGF 通路的相互作用, 对肿瘤新生血管的生成发挥调节作用, 影响肿瘤的发生发展以及肿瘤的转移和浸润<sup>[14-15]</sup>。有研究<sup>[16-20]</sup>发现 MEG3 和胰腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的发生发展有关, MEG3 的异常表达和肿瘤细胞的发生和分化关系密切; MEG3 在肿瘤细胞中表达下降, 能对抗肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤细胞的增殖, 和肿瘤的发生发展有关; MEG3 和结直肠癌的发生也有相关性, Yin 等<sup>[5]</sup>发现 MEG3 和结直肠癌细胞的增殖有关, 影响结直肠癌的发生发展; 朱栋良等<sup>[6]</sup>研究发现结直肠癌细胞中 MEG3 表达降低, 过表达 MEG3 可以一直结直肠癌细胞的侵袭和迁移。MEG3 对结直肠癌的影响是否和血管生成有关? 本研究对结直肠癌组织中 MEG3 的表达进行研究, 并探讨其与血管生成的关系, 结果发现, 结直肠癌组织中 MEG3 相对表达量低于正常结直肠组织。结直肠癌组织中 MEG3 的相对表达量和结直肠癌的肿瘤位置、浸润深度、分化程度和淋巴结转移没有显著相关性。结直肠癌组织中 VEGF 表达和血管密度高于癌旁正常结直肠癌组织中 VEGF 表达和血管密度。结直肠癌组织中 MEG3 表达水平和 VEGF 表达水平呈负相关, 和血管密度也呈负相关。

本研究结果表明, 结直肠癌组织中 MEG3 呈低表达, MEG3 表达水平和 VEGF 表达水平及血管密度呈负相关。VEGF 是重要的促血管生长因子, 能够调节血管内皮细胞的迁移和增殖, 能够改变

血管的通透性, Notch信号通路通过调节细胞的分化, 引导血管内皮细胞迁移, 稳定新生血管, 新生血管的大量生成是肿瘤生长的重要条件, 由此可以推测: MEG3可能通过抑制结直肠癌血管生成的机制抑制结直肠癌的发生发展, MEG3表达的下调促进结直肠癌血管的生成, 促进结直肠癌的发生发展。

## 参考文献

- [1] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding rnas in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4):452-463.
- [2] Sand M, Bechara FG, Sand D, et al. Expression profiles of long noncoding RNAs in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(4):501-518.
- [3] Liu S, Zhu J, Jiang T, et al. Identification of lncRNA MEG3 Binding Protein Using MS2-Tagged RNA Affinity Purification and Mass Spectrometry[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(7):1834-1845.
- [4] Xia Y, He Z, Liu B, et al. Downregulation of Meg3 enhances cisplatin resistance of lung cancer cells through activation of the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4530-4537.
- [5] Yin DD, Liu ZJ, Zhang E, et al. Decreased expression of long noncoding RNA MEG3 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6):4851-4859.
- [6] 朱栋良, 尹小平, 王芳元, 等. 长链非编码 RNA 母系表达基因3对结直肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(2):296-300.  
Zhu DL, Yin XP, Wang FY, et al. Effect of long non-coding RNA MEG3 on invasion and migration of colorectal cancer cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2015, 31(2):296-300.
- [7] 徐晓慧, 孙欣, 刘娜, 等. microRNA-25高表达与直肠癌细胞的侵袭和迁移的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(12):1716-1721.  
Xu XH, Sun X, Liu N, et al. Relations of high microRNA-25 expression with migration and invasion of rectal carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(12):1716-1721.
- [8] 汤首俊, 朱世凯. 长链非编码RNA在胰腺癌中的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(3):443-447.  
Tang SJ, Zhu SK. Long non-coding RNAs in pancreatic cancer: recent advances[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(3):443-447.
- [9] 何运, 陈攀, 罗嘉, 等. 长链非编码RNA在肝癌中的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):1069-1075.  
He Y, Chen P, Luo J, et al. Long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: recent research progress[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(7):1069-1075.
- [10] Li Y, Wang T, Li Y, et al. Identification of long-non coding RNA UCA1 as an oncogene in renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4):3326-3334.
- [11] Cheng CC, Guan SS, Yang HJ, et al. Blocking heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin reduces tumor hypoxia-mediated VEGF release and inhibits tumor angiogenesis as a potential therapeutic agent against colorectal cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23:18. doi: 10.1186/s12929-016-0219-6.
- [12] Kalitin NN, Karamysheva AF. RAR $\alpha$  mediates all-trans-retinoic acid-induced VEGF-C, VEGF-D, and VEGFR3 expression in lungcancer cells[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(4):456-464.
- [13] Forootan FS, Forootan SS, Gou X, et al. Fatty acid activated PPAR $\gamma$  promotes tumorigenicity of prostate cancer cells by up regulating VEGF via PPAR responsive elements of the promoter[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8):9322-9339.
- [14] 朱娟娟. LncRNA MEG3在肝癌细胞中的功能及作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014:7-11.  
Zhu JJ. Role of LncRNA MEG3 in hepatocellular carcinoma[D]. Changchun: Jilin University, 2014:7-11.
- [15] Zhang J, Yao T, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(1):104-113.
- [16] Zhuang W, Ge X, Yang S, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients by targeting BMP4 transcription[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6):1985-1997.
- [17] Hu D, Su C, Jiang M, et al. Fenofibrate inhibited pancreatic cancer cells proliferation via activation of p53 mediated by upregulation of LncRNA MEG3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(2):290-295.
- [18] Luo G, Wang M, Wu X, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6):2209-2220.
- [19] 晏江, 过晓强, 夏加增, 等. 胃癌组织中MEG3基因甲基化状态及其临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(12):2289-2292.  
Yan J, Guo XQ, Xia JZ, et al. Methylation Level of MEG3 Differentially Methylated Regions in Gastric Cancer and its Clinical Significance[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 14(12):2289-2292.
- [20] 陈瑞东, 胡端敏, 苏存锦, 等. 长链非编码RNA母源性印记基因3对人胰腺癌SW1990细胞生物学行为及p53蛋白水平的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(11):2846.  
Chen RD, Hu DM, Su CJ, et al. Effects of long non-coding RNA maternally expressed gene 3 on cell biological behavior and p53 expression in human pancreatic cancer SW1990 cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2015, 32(11):2846.

(本文编辑 宋涛)

**本文引用格式:** 赵月鸣, 邹玉凤, 董莹, 等. 母系印迹表达基因3在结直肠癌组织中表达及其与血管生成的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(10):1450-1454. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.014  
**Cite this article as:** Zhao YM, Zou YF, Dong Y, et al. Expression of maternally expressed gene 3 in colorectal cancer tissue and its relation with angiogenesis[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(10):1450-1454. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.014