

• 基础研究 •

长链非编码 RNA LOC100130476 在肾细胞癌的表达及启动子区甲基化状态*

张 晓 宇, 苏 建 志, 齐 盼, 卫 书 飞, 张 爱 莉[△]

050000 石家庄, 河北医科大学第四医院 泌尿外科

[摘要] 目的: 探讨 LOC100130476 在肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中的表达及启动子区甲基化状态。方法: 应用 RT-qPCR 和甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP)检测 RCC 中 LOC100130476 的表达及启动子区甲基化状态, 并分析与临床病理资料的关系; DNA 甲基转移酶抑制剂(5-Aza-dC)干预后的肾癌细胞系中, 采用 RT-qPCR 检测 LOC100130476 的表达及甲基化状态。结果: RT-qPCR 显示, LOC100130476 在 RCC 组织的表达明显低于正常组织(0.593 ± 0.306 vs 1.000 ± 0.018 , $t = -11.143$, $P < 0.001$), 并与淋巴结转移($t = 2.774$, $P = 0.007$)及临床分期($F = 5.436$, $P = 0.002$)相关。LOC100130476 在 3 株肾癌细胞系(A498、ACHN、786-O)的相对表达量均低于对照组(HK-2)($F = 107.068$, $P < 0.001$)。5-Aza-dC 处理后, LOC100130476 的表达均增高。MSP 显示, RCC 组织的甲基化率明显高于正常组织($\chi^2 = 33.273$, $P < 0.01$), 并与淋巴结转移有关($\chi^2 = 4.250$, $P = 0.039$); 3 株肾癌细胞系经 5-Aza-dC 处理后, A498、786-O 中 LOC100130476 甲基化消失, ACHN 中 LOC100130476 甲基化降低, 3 种细胞中 LOC100130476 非甲基化增高。结论: LOC100130476 在 RCC 中低表达, 并呈高甲基化状态, 其高甲基化可能是肾癌发生发展的分子机制之一。

[关键词] LOC100130476; 肾细胞癌; 甲基化

[中图分类号] R737.11; R73-37 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.11.001

引文格式: Zhang XY, Su JZ, Qi P, et al. Expression of long non-coding RNA LOC100130476 in renal cell carcinoma and its promoter methylation status[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(11): 985-991. [张晓宇, 苏建志, 齐盼, 等. 长链非编码 RNA LOC100130476 在肾细胞癌的表达及启动子区甲基化状态[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(11): 985-991.]

Expression of Long Non-coding RNA LOC100130476 in Renal Cell Carcinoma and Its Promoter Methylation Status

Zhang Xiaoyu, Su Jianzhi, Qi Pan, Wei Shufei, Zhang Aili

Department of Urology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Corresponding author: Zhang Aili, E-mail: zhangxiaoyulyh2001@163.com

This study was supported by grants from Health Commission of Hebei Province (No. 20201100).

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of LOC100130476 in renal cell carcinoma (RCC) and the methylation status of the promoter region. **Methods:** We used RT-qPCR and methylation-specific PCR (MSP) to detect the expression of LOC100130476 in RCC and the methylation status of the promoter region, and analyzed the relationship between LOC100130476 expression and clinicopathological characteristics. RT-qPCR was used to detect the expression and methylation status of LOC100130476 in renal cancer cell lines intervened with DNA methyltransferase inhibitor (5-Aza-dC). **Results:** RT-qPCR showed that the expression of LOC100130476 in RCC tissue was significantly lower than that in normal tissue (0.593 ± 0.306 vs 1.000 ± 0.018 , $t = -11.143$, $P < 0.001$), and LOC100130476 expression was related to lymph node metastasis ($t = 2.774$, $P = 0.007$) and clinical stage ($F = 5.436$, $P = 0.002$). The relative expression levels of

LOC100130476 in three RCC cell lines (A498, ACHN and 786-O) were lower than that in the control group (HK-2) ($F = 107.068$, $P < 0.001$). The expression levels of LOC100130476 in A498, ACHN and 786-O increased after being treated with 5-Aza-dC. MSP showed that the methylation rate in RCC tissue was significantly higher than that in normal tissue ($\chi^2 =$

[收稿日期] 2020-10-09 **[修回日期]** 2021-09-14

[基金项目] * 河北省卫生厅科技成果推广课题(编号:20201100)

[通讯作者] [△] 张爱莉, E-mail: zhangxiaoyulyh2001@163.com

33.273, $P < 0.01$), and it was related to lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.250, P = 0.039$); after being treated with 5-Aza-dC, the methylation of A498 and 786-O disappeared, that of ACHN decreased, and the unmethylation of A498, ACHN and 786-O increased. **Conclusion:** LOC100130476 is lowly expressed and hypermethylated in RCC. Its hypermethylation may be one of the molecular mechanisms of the occurrence and development of RCC.

[Key words] LOC100130476; Renal cell carcinoma; Methylation

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)为常见恶性肿瘤,约占成人恶性肿瘤的 2% ~ 3%,其死亡率呈不断增长的态势,全球每年约有 10 万人死于 RCC,严重威胁人类的健康^[1]。肾透明细胞癌是 RCC 最常见的亚型,多发生于近端小管,约占肾癌的 75%^[2]。随着 RCC 诊疗技术的不断进步,早期确诊的患者可通过手术治愈,但术后仍有 20% ~ 40% 的患者发生复发或远处转移,且大多数患者在诊断时已处于中晚期,预后较差。尽管靶向药物可以改善患者的生存率,但耐药性几乎是不可避免的^[3]。因此,探索 RCC 发生发展的具体机制,寻找有效的肿瘤转移和耐药靶点,对 RCC 的诊断和治疗具有深远的意义。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度大于 200 bp 的 RNA 分子,其特点为缺乏可识别的开放阅读框,以及不具有编码蛋白质的能力^[4]。研究表明,lncRNA 在肿瘤的发生和发展中起着重要作用,其调控方式包括介导染色质重塑、组蛋白修饰、转录和转录后调控^[5]。由于 lncRNA 表达的组织特异性,一些特定的 lncRNA 可成为肿瘤诊断和治疗的有效分子靶标。LOC100130476 又名 WAKMAR2,是位于 6q23.3 的 lncRNA。研究表明,LOC100130476 与食管鳞癌和胃贲门腺癌的侵袭、转移以及患者预后紧密相关^[6-7],但 LOC100130476 在 RCC 的研究较少。本研究旨在检测 RCC 中 LOC100130476 的表达和甲基化状态,分析其表达与甲基化状态的相关性,揭示 LOC100130476 甲基化在 RCC 进展中的作用,为 RCC 的诊断与治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;FBS 购自德国 Pan-Biotech 公司;TRIzol 购自北京索莱宝公司;逆转录试剂盒、绿色体系和 Wizard DNA 纯化试剂盒购自美国 Promega 公司;引物由北京赛百盛公司合成;5-Aza-dC 购自 Sigma 公司。

1.2 研究对象及标本来源

组织标本取自河北医科大学第四附属医院泌尿

外科 2018 年 7 月 1 日至 2020 年 7 月 1 日确诊为肾癌的手术患者,所有患者的临床资料均来自病历记录。肾癌患者 70 例,其中男性 42 例(60%),女性 28 例(40%)。60 岁以下 26 例(37.14%),60 岁以上 44 例(62.86%)。所有患者未接受术前放疗或化疗。每对标本均取肾癌原发灶及距原发灶 5 cm 以上的相应正常组织(针对较大肿瘤,尽可能选取距原发灶 2 cm 以上的正常组织),并将标本分为两部分,一部分以新鲜状态放入组织固定液(RNA later)中,在 4℃ 冰箱孵育过夜,然后转移到 -80℃ 冰箱中以备提取 RNA;另一部分用 4% 中性甲醛溶液固定,常规制备蜡块,切 4 μm 切片用于 HE 染色和病理分析。肿瘤组织标本由 3 位病理医师诊断为肾透明细胞癌,且在正常组织中没有癌细胞浸润。所有标本均具有完整的病理诊断和临床数据,患者的临床分期符合美国癌症联合会和国际抗癌联盟的标准,肿瘤病理分级符合 WHO 标准。本研究的所有患者均已签署了经河北医科大学第四医院伦理委员会批准的知情同意书(伦理编号:2020k-1147)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将肾癌细胞系(A498、ACHN、786-O)及人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2)置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,并在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.3.2 5-Aza-dC 药物干预 将对数生长期细胞分为 2 组:1) 未处理组:不加药,加入等体积培养液;2) 5-Aza-dC 处理组:按参考文献^[6]将 5 μmol/L 5-Aza-dC 加入到培养基中培养 48 h。

1.3.3 RT-qPCR 检测 根据 TRIzol 试剂说明书,从 HK-2 细胞、肾癌细胞系、肾癌及相应正常组织样本中提取总 RNA。根据逆转录试剂盒说明书,将总 RNA 逆转录成 cDNA,然后以 cDNA 为模板,以 β-肌动蛋白(β-Actin, ACTB)作为内参,进行 RT-qPCR 扩增。RT-qPCR 引物如下,LOC100130476 上游引物:F:5'-AGACAGTCTAACCGTGGGGTA-3',下游引物:R:5'-CCCAAATTGTRCCGGACCAG-3';ACTB 上游引物:F:5'-ACCGAGCGCGGCTACAG-3',下游引物:R:5'-CT-TAATGTCACRCCCGATT TCC-3'。RT-qPCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min 后;95℃ 变性 15 s、60℃ 退火

30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 每个样本设 3 个复孔。根据每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数记为该组织中 LOC100130476 和 ACTB 基因转录水平的 CT 值。采用相对定量法: $\Delta CT = CT_{LOC100130476} - CT_{ACTB}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{癌组织} - \Delta CT_{配对正常组织}$, 以 $N = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因的相对表达量, 其数值表示癌组织与正常组织的相对倍数, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.4 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 检测 采用酚/氯仿抽提法, 提取组织 DNA, 定量后, 将适量的 DNA 用 2 mol/L 氢氧化钠变性, 置 10 mmol/L 氢醌和 3 mmol/L 亚硫酸氢钠中 50 °C 反应 16 h, 然后用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA 样品。经亚硫酸盐处理后, 单链 DNA 的未甲基化胞嘧啶可通过亚硫酸氢盐脱氨作用转化为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不能被修饰。根据这一原理, 并结合 Meth primer 软件, 分别设计该基因的甲基化及

非甲基化引物, 然后进行扩增和 MSP 检测。图 1 中显示了 LOC100130476 转录起始点上游 1 000 bp 及 CpG 岛的分布情况, 黑色箭头标示 MSP 引物所在的位置。甲基化引物: F: 5'-TATTGCGGTATTT-TACGTTTCGTCG-3', R: 5'-AAACGCCCTCGAAC-CCTCCGATCG-3' (产物长度 169 bp); 非甲基化引物: F: 5'-TATTGTGGTATTTTATGTTTTGTTG-3', R: 5'-AAACACCCCTCAAACCCTCCAATCA-3' (产物长度 169 bp)。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 10 min 后, 95 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环后进行数据统计。用经甲基化酶处理以后的基因组 DNA 作为甲基化的阳性对照, 用正常人外周血 DNA 作为非甲基化的阳性对照, 阴性对照则用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。另随机选取 10% 标本进行重复实验以验证结果的可靠性。

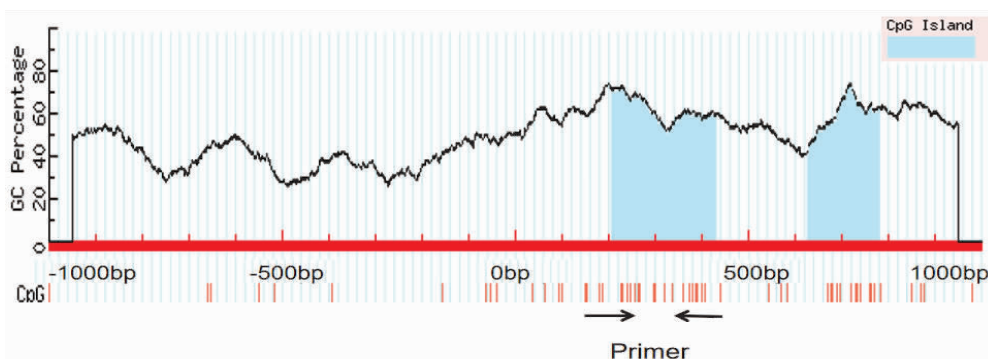


图 1 LOC100130476 CpG 岛及引物位置
Figure 1. CpG Island and Primer Position of LOC100130476

1.3.5 MSP 结果判定 使用凝胶电泳成像和 GeneSys 软件进行图像分析。MSP 的结果如下: 1) 甲基化: 甲基化特异性引物 (M) 扩增出目标条带, 而非甲基化特异性引物 (U) 未扩增; 2) 非甲基化: 非甲基化引物 (U) 扩增出靶条带, 而甲基化的引物 (M) 未扩增; 3) 甲基化不完全: 这两对引物均具有靶条带扩增功能, 并包含在非甲基化中以进行统计分析。甲基化率是发生完全甲基化和不完全甲基化标本数占总标本数的百分比。随机选择 10% 的样品进行重复测试, 空白对照没有扩增产物, 则说明结果可靠^[8]。

1.4 统计学方法

SPSS 21.0 统计软件用于数据统计分析。首先对计量资料进行正态性检验, 正态分布、方差齐的计量资料, 两组采用两个随机样本的 *t* 检验进行组间分析; 药物处理前后两组比较采用配对 *t* 检验。多组间均数比较采用单因素方差分析, 组内两两多重

比较采用 SNK-*q* 检验; 统计量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料的组间比较采用四格表 χ^2 检验; 以上结果均采用双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LOC100130476 在肾癌及其相应正常组织中的表达情况

肾癌组织中 LOC100130476 的表达明显低于其相应正常组织 (0.593 ± 0.306 vs 1.000 ± 0.018 , $t = -11.143$, $P < 0.001$) (图 2)。结合表 1 的临床病理资料分析, LOC100130476 在无淋巴结转移组的表达高于有淋巴结转移组 (0.736 ± 0.367 vs 0.527 ± 0.251 , $t = 2.774$, $P = 0.007$), 并与临床分期相关 ($F = 5.436$, $P = 0.002$); 按照年龄、性别以及分化程度分组进行统计分析, LOC100130476 的表达差异均不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

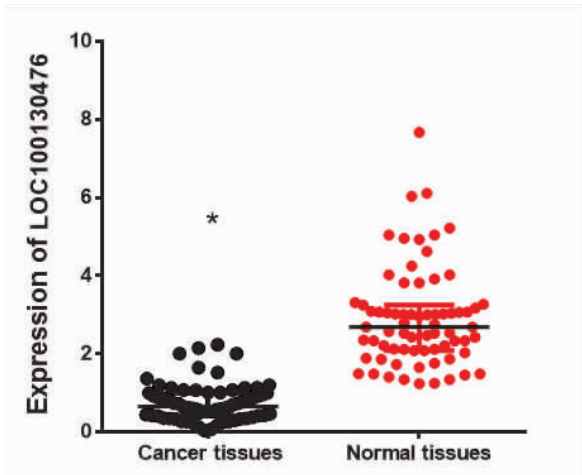


图2 肾癌组织及其相应正常组织中 LOC100130476 表达
Figure 2. Expression of LOC100130476 in RCC and Normal Tissues

* $P < 0.001$.

2.2 LOC100130476 在肾癌细胞系中的表达情况

HK-2 作为正常细胞对照组, RT-qPCR 分析结果显示, LOC100130476 在 786-O、ACHN、A498 肾癌

细胞的相对表达量分别为 0.338 ± 0.029 、 0.144 ± 0.016 、 0.133 ± 0.018 , 均低于对照组 1.102 ± 0.149 , 差异有统计学意义 ($F = 107.068, P < 0.001$), 其中 786-O、ACHN、A498 各自与正常细胞 HK-2 相比, 差异均具有统计学意义 ($t = 8.737, P = 0.001; t = 11.090, P < 0.001; t = 11.215, P < 0.001$; 图 3)。

2.3 经 5-Aza-dC 处理前后 LOC100130476 在肾癌细胞系的表达情况

使用配对 t 检验进行统计(图 4), LOC100130476 在 786-O 未处理组的表达量为 1.105 ± 0.096 , 5-Aza-dC 处理组为 3.943 ± 0.321 , 差异具有统计学意义 ($t = -12.531, P = 0.006$); LOC100130476 在 ACHN 未处理组的表达量为 0.473 ± 0.053 , 5-Aza-dC 处理组为 2.110 ± 0.273 , 差异具有统计学意义 ($t = -11.990, P = 0.007$); LOC100130476 在 A498 未处理组的表达量为 0.434 ± 0.058 , 5-Aza-dC 处理组为 4.398 ± 0.386 , 差异具有统计学意义 ($t = -18.603, P = 0.003$)。

表 1 70 例肾癌组织中 LOC100130476 表达与临床病理特征的关系

Table 1. Relationship between LOC100130476 Expression and Clinicopathological Characteristics in 70 Cases of RCC

Clinicopathological characteristic	N	Expression of RNA LOC100130476			Methylation frequency of LOC100130476		
		Mean	t/F	P	n/N(%)	χ^2	P
Age							
≤60 years	26	0.576 ± 0.274	-0.358	0.722	19/26 (73.08%)	0.742	0.389
>60 years	44	0.603 ± 0.326			36/44 (81.82%)		
Gender							
Male	42	0.555 ± 0.236	-1.294	0.200	34/42 (80.95%)	0.354	0.552
Female	28	0.651 ± 0.386			21/28 (75.00%)		
Lymph node metastasis							
No	22	0.736 ± 0.367	2.774	0.007	14/22 (63.64%)	4.250	0.039
Yes	48	0.527 ± 0.251			41/48 (85.42%)		
Pathological differentiation							
Well or moderate	42	0.589 ± 0.326	-0.134	0.894	32/42 (76.19%)	0.354	0.552
Poor	28	0.599 ± 0.275			23/28 (82.14%)		
Clinical stage							
I	6	0.773 ± 0.177	5.436	0.002	4/6 (66.67%)	4.709	0.194
II	12	0.836 ± 0.430			7/12 (58.33%)		
III	42	0.499 ± 0.240			36/42 (85.71%)		
IV	10	0.510 ± 0.263			8/10 (80.00%)		

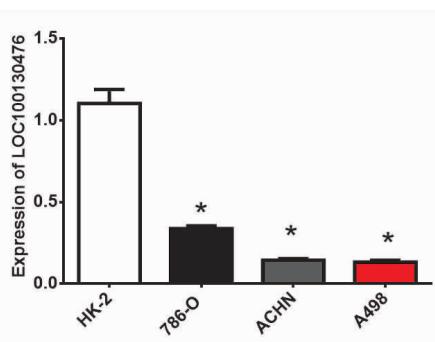


图 3 LOC100130476 在肾癌细胞系中的表达
Figure 3. Expression of LOC100130476 in RCC Cell Lines

* $P < 0.05$.

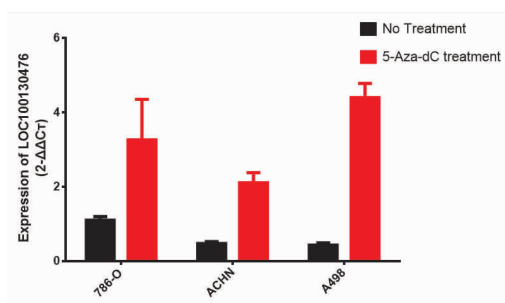


图 4 5-Aza-dC 处理前后肾癌细胞系中 LOC100130476 的表达
Figure 4. Expression of LOC100130476 in RCC Cell Lines before and after Being Treated with 5-Aza-dC

2.4 LOC100130476 在肾癌及其相应正常组织中的甲基化状态

MSP 结果显示, LOC100130476 在肾癌和相应正常组织中的甲基化率分别为 [78.57% (55/70) vs 30.00% (21/70), $\chi^2 = 33.273, P < 0.01$]。结合临床病理特征发现(表 1), 有淋巴结转移患者显著高于无淋巴结转移患者 [85.42% (41/48) vs 63.64% (14/22), $\chi^2 = 4.250, P = 0.039$]; 按照年龄、性别、分化程度、临床分期进行统计分析, 肾癌组织 LOC100130476 甲基化率差异均不具有统计学意义。图 5 显示为部分病例肾癌组织的甲基化状态, case1 有未甲基化表达, 可能是组织差异造成的。

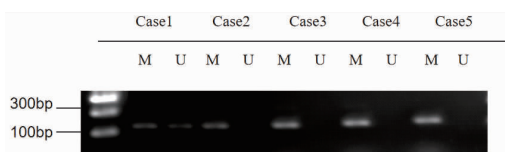


图 5 肾癌组织中 LOC100130476 的甲基化状态
Figure 5. Methylation Status of LOC100130476 in RCC Tissue

M: Methylated primer; U: Unmethylated primer.

2.5 LOC100130476 在肾癌细胞系中的甲基化状态

MSP 结果(图 6)显示, 5-Aza-dC 处理前 A498、ACHN、786-O 细胞系中 LOC100130476 呈高甲基化状态; 5-Aza-dC 处理的 3 株细胞系使用甲基化引物进行扩增后, LOC100130476 在 A498 和 786-O 细胞系中甲基化程度均消失, 在 ACHN 细胞中甲基化程度降低; 使用非甲基化引物进行扩增, A498、ACHN、786-O 的 LOC100130476 非甲基化程度均显著增高。

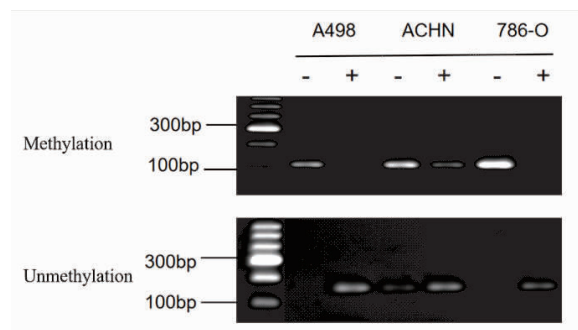


图 6 肾癌细胞系中 LOC100130476 的甲基化状态
Figure 6. Methylation Status of LOC100130476 in RCC Cell Lines

- : Before being treated with 5-Aza-dC; + : After being treated with 5-Aza-dC

3 讨论

RCC 为常见的恶性肿瘤, 探索 RCC 发生发展的具体机制, 寻找有效的肿瘤转移和耐药靶点, 具有深远的意义。LncRNA 曾被视为 RNA 聚合酶 II 转录的“噪音”, 没有任何生物学功能^[9]。但最近研究证实 lncRNA 在生物调控过程中扮演重要的作用, 如染色质修饰、X 染色体沉默、转录激活、基因组印迹、转录干扰和核内转运^[10]。同时 lncRNA 可成为肿瘤诊断和治疗的有效指标。Li 等^[11] 研究发现, lncRNA PLK1S1 在 RCC 组织和细胞中上调, 并与患者临床分期相关, PLK1S1 高表达患者的总生存时间更短。生信及荧光素酶报告基因表明, PLK1S1 可通过 miR653/CXCR5 轴促进 RCC 进展和索拉非尼耐药。Yang 等^[12] 研究发现, lncRNA FGD5-AS1 在肾癌组织中高表达, 并与 miR-5590-3p 竞争性相互作用并调节 ERK/AKT 的下游信号传导, 促进 RCC 的增殖和转移。Wang 等^[13] 研究发现, 在舒尼替尼耐药的 RCC 组织和细胞系中, MALAT1 表达显著上调。LncRNA MALAT1 通过 miR-362-3p/G3BP1 来促进 SU 化学耐药性。

LOC100130476 位于 6q23.3, 与食管鳞癌、胃贲门腺癌侵袭转移以及预后紧密相关^[14-15]。本研究检测 LOC100130476 在 RCC 组织、正常组织及细胞系中的表达情况, 结果表明, 癌组织中 LOC100130476 的表达水平明显低于正常组织, 在肾癌细胞系(A498、ACHN、786-O)及人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2)中, LOC100130476 在 3 种 RCC 细胞的表达均低于对照组。进一步分析 LOC100130476 的表达水平与临床病理数据的关系发现, LOC100130476 的表达水平与 RCC 的淋巴结转移及临床分期有关。提示 LOC100130476 可能在 RCC 中起抑癌基因的作用。

RCC 是多基因和多阶段突变积累的病理过程。肿瘤细胞基因组 DNA 中常伴有广泛低甲基化和局部异常高甲基化^[16]。DNA 甲基化在真核细胞中多发生于 CpG 位点, 在 DNA 甲基化转移酶作用下, 使 CpG 二核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为 5'-甲基胞嘧啶^[17], 常见的具有甲基化活性的 DNMTs 主要为 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B^[18]。基因启动子区 CpG 位点常呈聚集状态, 称为 CpG 岛, 在人类正常基因组中呈低甲基化状态, 可调控基因转录活性, 与肿瘤的发生发展密切相关^[19]。近年来, 随着对基因组研究的不断深入, 发现表观遗传学修饰可作为“开关”调控 lncRNAs 在肿瘤中作用^[20]。抑癌基因启动子中 CpG 岛的异常甲基化导致基因表达下降并诱导肿瘤形成^[21]。通过 UCSC 序列检索并结合 CpG 岛预测软件 Meth primer 分析发现, LOC100130476 有三个 CpG 岛, 长度分别为 224 bp、768 bp、151 bp, 在食管癌和贲门腺癌中 LOC100130476 甲基化主要表现在第一个 CpG 岛, 本研究推测启动子区 CpG 岛的高甲基化可能是 LOC100130476 表达异常的机制之一。因此, 本课题组从 RCC 的甲基化状态和 LOC100130476 的表达入手, 初步探讨了 LOC100130476 甲基化在 RCC 发生发展中的作用机制。

本实验应用的干预药物 5-Aza-dC 是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂, 抑制 DNA 甲基化, 通过诱导细胞周期停滞、凋亡、DNA 损伤等来发挥其抗肿瘤活性, 应用于多种恶性肿瘤的治疗。我们检测了 LOC100130476 在 RCC 细胞系(A498、ACHN、786-O)中 5-Aza-dC 处理前后表达水平的改变, 初步探究其表观遗传学机制。实验发现 LOC100130476 在 RCC 细胞系(A498、ACHN、786-O)中 5-Aza-dC 单独处理后表达均上调, 这一结果提示 LOC100130476 在 RCC 中的低表达可能受到 DNA 甲基化的调控,

并且这一修饰过程可被 5-Aza-dC 不同程度逆转。我们进一步应用 MSP 的方法在 70 例 RCC 和相应癌旁正常组织中检测 LOC100130476 启动子区的甲基化状态, 结果显示 LOC100130476 启动子区在 RCC 组织中呈高甲基化状态, 显著高于其相应癌旁正常组织, 且该位点甲基化率与 RCC 淋巴结转移密切相关, 提示 LOC100130476 启动子区 DNA 异常高甲基化可能是 RCC 中 LOC100130476 表达下调的主要机制之一, 该区域 CpG 位点, 对基因的表达起关键调控作用。我们进一步深入研究, 应用 MSP 的方法检测 LOC100130476 在 RCC 细胞系(A498、ACHN、786-O)中的甲基化状态, 结果发现在 5-Aza-dC 处理前, 3 株细胞系中 LOC100130476 启动子区表现为高甲基化状态, 而在 5-Aza-dC 处理后, LOC100130476 启动子区甲基化程度均有不同程度降低或表现为非甲基化状态, 这一结果证实, LOC100130476 启动子区呈高甲基化状态, 并且其高甲基化状态可抑制基因表达。在本实验中部分 RCC 细胞系的高甲基化状态没有被 5-Aza-dC 干预完全逆转, 分析可能的原因有: 1) 同一基因 CpG 岛区域在不同细胞系中 DNA 甲基化程度不同; 2) 5-Aza-dC 药物剂量较低或处理时间不足导致甲基化状态未完全逆转; 3) 可能存在如组蛋白乙酰化等其他机制而导致该基因沉默表达。研究结果显示经 5-Aza-dC 干预后的细胞中 LOC100130476 的表达均显著升高, 5-Aza-dC 能逆转 LOC100130476 启动子区的异常甲基化状态, 使 LOC100130476 重新表达, 并起到抑癌基因的作用。经 5-Aza-dC 处理后, LOC100130476 的甲基化程度明显降低, 非甲基化引物的表达明显升高。表明 LOC100130476 启动子区甲基化与其基因表达相关, 进一步验证了 LOC100130476 异常甲基化是导致该基因失活的机制之一。因此, 应不断研究 DNA 甲基化与基因表达之间的相关性, 为 RCC 的早期诊断和脱甲基治疗提供依据。

综上所述, LOC100130476 在肾癌中低表达, 其启动子区的高甲基化是导致基因表达沉默的机制之一, 5-Aza-dC 可以逆转 LOC100130476 启动子区域的异常甲基化并提高其表达水平。总之, 希望本研究为 LOC100130476 启动子区甲基化和异常表达的研究提供新的思路和理论依据。

作者声明: 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任; 并承诺论文中涉

及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端: 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议: 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权: 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Capitanio U, Bensalah K, Bex A, *et al.* Epidemiology of renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol*, 2019, 75(1) : 74-84.
- [2] Aghamir SMK, Heshmat R, Ebrahimi M, *et al.* The impact of succinate dehydrogenase gene (SDH) mutations in renal cell carcinoma (RCC): A systematic review[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12 : 7929-7940.
- [3] Deng J, Li L, Xia H, *et al.* A comparison of the prognosis of papillary and clear cell renal cell carcinoma: Evidence from a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(27) : e16309.
- [4] Qian XY, Zhao JY, Yeung PY, *et al.* Revealing lncRNA structures and interactions by sequencing-based approaches[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(1) : 33-52.
- [5] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008 : 1-46.
- [6] 师雅斌. 长链非编码 RNA LOC100130476 在食管鳞癌及贲门腺癌中的表达及其甲基化状态[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [7] 师雅斌,郭炜,崔建利,等. 非编码长链 RNA LOC100130476 在食管鳞癌中的表达及其甲基化状态[J]. *肿瘤*, 2015, 35(8) : 866-873.
- [8] 郭艳丽,邓良勇,郭炜,等. 转录因子 SOX7 基因在贲门腺癌中的异常表达及其甲基化状态[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(6) : 652-657.
- [9] Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, *et al.* HOTAIR lncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 503 : 1-18.
- [10] McDonel P, Guttman M. Approaches for understanding the mechanisms of long noncoding RNA regulation of gene expression[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(12) : a032151.
- [11] Li W, Yang D, Zhang Y, *et al.* Long non-coding RNA PLK1S1 was associated with renal cell carcinoma progression by interacting with microRNA-653 and altering C-X-C chemokine receptor 5 expression[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5) : 1985-1996.
- [12] Yang Y, Dong MH, Hu HM, *et al.* lncRNA FGD5-AS1/miR-5590-3p axis facilitates the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma through ERK/AKT signalling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17) : 8756-8766.
- [13] Wang Z, Chang X, Zhu G, *et al.* Depletion of lncRNA MALAT1 inhibited sunitinib resistance through regulating miR-362-3p-mediated G3BP1 in renal cell carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(16) : 2054-2062.
- [14] Guo W, Dong Z, Shi Y, *et al.* Methylation-mediated downregulation of long noncoding RNA LOC100130476 in gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(5) : 497-508.
- [15] Guo W, Dong Z, Shi Y, *et al.* Aberrant methylation-mediated downregulation of long noncoding RNA LOC100130476 correlates with malignant progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(8) : 961-9.
- [16] 王思毓,刘珊,刘艳艳,等. 结直肠癌差异表达及预后相关基因分析[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2021, 34(6) : 509-519.
- [17] Usui G, Matsusaka K, Mano Y, *et al.* DNA methylation and genetic aberrations in gastric cancer[J]. *Digestion*, 2021, 102(1) : 25-32.
- [18] Chen X, Zhang J, Ruan W, *et al.* Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(12) : 6278-6289.
- [19] Zappe K, Cichna-Markl M. Aberrant DNA methylation of ABC transporters in cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(10) : 2281.
- [20] Lau CE, Robinson O. DNA methylation age as a biomarker for cancer[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(11) : 2652-2663.
- [21] Mazdak M, Tezval H, Callaugh JC, *et al.* DNA methylation of sarcosine dehydrogenase (SARDH) loci as a prognosticator for renal cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(5) : 2159-2168.