

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00400

## Let-7c 在乳腺浸润性导管癌中的表达及临床意义

沈淑蓉<sup>1</sup>, 施俊义<sup>1\*</sup>, 沈 贤<sup>2</sup>, 黄关立<sup>2</sup>, 薛向阳<sup>2</sup>

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

2. 温州医学院附属第一医院普通外科, 温州 325000

**[摘要]** **目的:**探讨 Let-7c 在乳腺浸润性导管癌中的表达情况及与各种临床病理特征的关系。**方法:**采用茎环 RT-PCR 方法检测 40 例乳腺浸润性导管癌及其对应的正常乳腺组织中 Let-7c 的表达, 分析 Let-7c 表达与临床分期、淋巴结转移、增殖指数等临床病理特征的关系。**结果:**用茎环 RT-PCR 方法检测 Let-7c 表达的敏感性和特异性良好; Let-7c 在乳腺癌组织中的表达显著低于正常组织 ( $P < 0.05$ ); Let-7c 的表达与乳腺癌的增殖指数有关 ( $P < 0.05$ ), 与雌孕激素受体状态亦有关, 与是否绝经、乳腺癌的 TNM 分期、淋巴结转移未见显著统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在高增殖指数、雌孕激素受体阴性的肿瘤组 Let-7c 表达明显降低。**结论:**Let-7c 在乳腺浸润性导管癌中的表达异常, 可能和乳腺癌的发生和发展有关, 有望成为乳腺癌新的预后指标及治疗靶点。

**[关键词]** Let-7c 基因; 微 MicroRNA; 乳腺肿瘤; 乳腺导管癌

**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0400-04

### Expression of Let-7c in invasive ductal carcinoma of breast cancer and its clinical significance

SHEN Shu-rong<sup>1</sup>, SHI Jun-yi<sup>1\*</sup>, SHEN Xian<sup>2</sup>, HUANG Guan-li<sup>2</sup>, XUE Xiang-yang<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of Let-7c in patients with invasive ductal carcinoma of the breast cancer and its correlation with the clinicopathologic features of the patients. **Methods:** The expression of Let-7c was examined in 40 tissues of invasive ductal carcinoma of the breast cancer and their matched non-tumor adjacent tissue specimens by stem-loop real-time RT-PCR. The correlation of the expression with the clinicopathological features of breast cancer, such as the clinical staging, lymphatic metastasis, and proliferation index, was analyzed. **Results:** The stem-loop realtime RT-PCR was sensitive and specific in detecting Let-7c expression. Expression of Let-7c in breast cancer tissues was significantly lower than that in the adjacent normal tissues ( $P < 0.05$ ). Down-regulation of Let-7c expression was associated with higher proliferation index ( $Ki-67 > 10\%$ ) ( $P = 0.030$ ) and the status of Estrogen/Progesterone receptor ( $P = 0.040/0.034$ ) in breast cancer patients. There was no significant association of Let-7c expression with menopause condition, breast cancer TNM clinical stage, or lymphatic metastasis ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Our results suggest Let-7c may play an important role in the development of breast cancer and the level of Let-7c expression may be a potential parameter in forecasting the progression and prognosis of breast cancer patients.

**[KEY WORDS]** Let-7c gene; MicroRNAs; breast neoplasms; breast ductal carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 400-403]

近年来在多种真核细胞和病毒中发现的一类非编码蛋白的短序列(21~23个核苷酸)RNA片段,即MiRNA(MicroRNA),它通过碱基配对原则结合到目标mRNA上进而抑制该mRNA翻译,起着调控基因功能的作用,在肿瘤的发生过程中起到调控的枢纽作用。具9个成员之多的Let-7家族(Let-7a~

Let-7i)可以抑制肿瘤细胞的生长,具有肿瘤抑制作用,尤其是Let-7c在多种肿瘤中表达下调。本研究通过茎环RT-PCR方法检测了40例乳腺浸润性导管癌中Let-7c的表达,分析它们和临床病理特征的联系,探讨Let-7c在乳腺癌中的作用。

**[收稿日期]** 2008-09-07 **[接受日期]** 2009-02-12

**[基金项目]** 温州市卫生局课题(2007010). Supported by Health Administration Foundation of Wenzhou(2007010).

**[作者简介]** 沈淑蓉, 硕士, 主治医师, 现在温州中西医结合医院工作, 邮编: 325000. E-mail: shenxian5166@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873364, E-mail: shijunyi666@yeah.net

## 1 材料和方法

1.1 临床资料 2007年5月至2008年5月,温州医学院附属第一医院肿瘤科行手术治疗的乳腺浸润性导管癌患者40例,均为女性,术前未行放、化疗及内分泌治疗,年龄35~77岁,中位年龄53岁,组织病理类型的判断标准参照2003版WHO乳腺肿瘤的病理学分类。其他临床病理资料见表1。每例标本留取肿瘤组织及对应的距肿瘤5 cm以上的正常乳腺组织,离体后10 min内置于液氮保存待做RT-PCR分析,同时留取1份标本待行免疫组化染色,10%甲醛固定,石蜡包埋。

表1 乳腺浸润性导管癌中Let-7c表达和临床病理因素的相关性

Tab 1 Expression of Let-7c and its correlation with clinicopathological features of invasive ductal carcinoma of breast cancer

Clinicopathological features	N	Let-7c level	P value
Menopause condition			0.357
Premenopause	16	0.356 2±0.144 3	
Postmenopause	24	0.410 6±0.225	
Tumor size			0.723
≤2 cm	17	0.390 0±0.195 9	
>2 cm	23	0.369 1±0.172 1	
TNM clinical stage			0.469
I	10	0.436 0±0.209 7	
II	22	0.367 3±0.174 1	
III	8	0.335 0±0.163 5	
ER			0.04
Positive	13	0.492 3±0.226 2	
Negative	27	0.323 0±0.124 8	
PR			0.034
Positive	23	0.429 6±0.193 3	
Negative	17	0.308 2±0.137 9	
Lymph node metastasis			0.339
Positive	19	0.348 9±0.200 2	
Negative	21	0.404 3±0.161 0	
Proliferation index (Ki-67)			0.03
≤10%	18	0.445 6±0.184 8	
>10%	22	0.322 7±0.160 4	

1.2 主要试剂 TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;M-MLV逆转录酶、RNA酶抑制剂、oligo dT、dNTPs等购自TaKaRa;KOD-plus、SYBR Mastermix购自Toyobo;引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 总RNA的提取 取液氮保存的乳腺肿瘤及正常乳腺组织标本,用刀片切成薄片,在液氮中碾碎至粉状,按TRIzol试剂说明书提取总RNA,DEPC处理过的蒸馏水溶解。采用德国EPPENDORF公司分光光度计(Biophotometer)检测RNA溶液 $D_{260}/$

$D_{280}$ 光密度(D)值,计算RNA浓度和纯度, $D_{260}/D_{280}$ 比值>1.8方可用于检测。1%琼脂糖变性凝胶电泳检测RNA的完整性。

1.4 Let-7c表达分析 MiRNA茎环RT-PCR分析参考文献,表2为相关分析的引物序列。1 μg总RNA以MiRNA茎环RT引物进行逆转录,反应条件为:16℃ 30 min,42℃ 30 min,75℃ 15 min,反应结束后-20℃保存。为准备定量PCR内参模板cDNA,用与进行茎环RT反应相同的总RNA标本,以oligo dT为逆转录引物进行逆转录。反应条件为:模板与oligo dT混合后,70℃ 10 min,立即冰上2 min,随后加入配制的逆转录反应液,42℃ 30 min,随后70℃ 15 min终止反应,-20℃保存样品。以15 μl反应体系进行Real-time定量PCR。MiRNA检测反应体系包括:1 μl RT产物,1×SYBR Green I Mastermix,0.5 μmol/L MiRNA特异前向引物、0.5 μmol/L通用的反向引物。GAPDH内参分析除使用1 μl oligo dT逆转录的RT产物外,使用0.5 μmol/L特异的前向和反向引物。Real-time定量PCR条件为:95℃ 10 min后,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40循环。Real-time定量PCR使用Applied Biosystems 7300仪器进行。所有样品做3复孔。PCR产物经8%PAGE电泳分析。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即Ct值,以GAPDH作为内参照,采用定量PCR中的相对定量法,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示肿瘤组织目的基因的表达相对于配对的正常组织的变化倍数,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Let-7} - Ct_{GAPDH})_{肿瘤} - (Ct_{Let-7} - Ct_{GAPDH})_{正常}$ 。

1.5 统计学处理 Let-7c的表达数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 13.0统计软件的t检验和方差分析进行统计处理,取 $P < 0.05$ 为假设检验有统计学意义的标准。

## 2 结果

2.1 乳腺癌及配对正常乳腺组织中Let-7c表达水平的茎环Real-time RT-PCR检测 以GAPDH为内参,我们采用Tang等<sup>[2]</sup>建立的茎环RT-PCR分析Let-7c表达。8%PAGE电泳显示PCR产物为单一条带(图1A)、Real-time PCR产物单峰的熔解曲线(图1B)均说明茎环RT-PCR能特异扩增Let-7c片段。图1C的扩增曲线还可见,乳腺癌组织中Let-7c的Ct值明显低于对应的正常乳腺组织,说明Let-7c在乳腺癌组织表达下降。癌组织Let-7c相对表达量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )约为 $0.378 \pm 0.180$ ,和对应的正常乳腺组织的表达差异有显著性( $P < 0.01$ )。

表 2 MiRNA 茎环 RT-PCR 检测相关引物序列

Tab 2 Oligonucleotide sequences of MiRNA

Primer	Sequence(5'-3')
Let-7c	
RT stem-loop primer	CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG AAC CAT AC
Forward primer	ACA CTC CAG CTG GGT GAG GTA GTA GGT TGT
Common reverse primer	GTG TCG TGG AGT CGG CAA TTC
GAPDH	
Forward primer	CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG TAA
Reverse primer	GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TGT

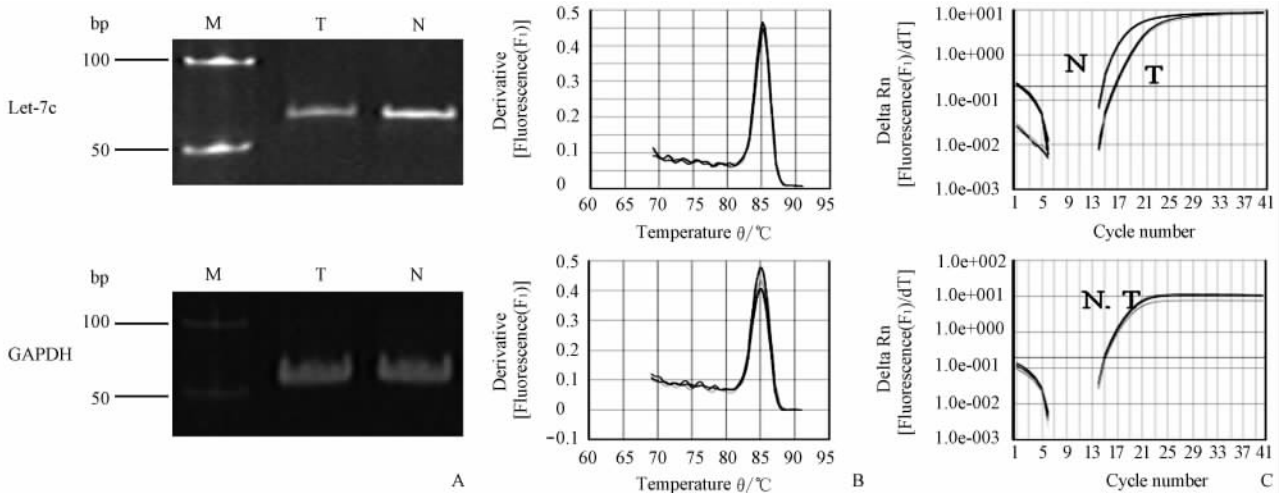


图 1 茎环 RT-PCR 分析 Let-7c 在乳腺癌及正常组织的表达

Fig 1 Expression of Let-7c in breast cancer and normal tissue by stem-loop RT-PCR

A: Electrophoresis of PCR product of Let-7c and GAPDH. M: 50 bp DNA marker; T: Breast cancer tissue; N: Normal tissue. B: Deliquescence curve of real-time PCR; C: Amplification curve of real-time PCR

2.2 乳腺癌中 Let-7c 与多种临床病理特征的关系 由表 1 可见, Let-7c 在乳腺癌的不同的增殖指数(Ki-67)中, 表达水平不同, 差异有统计学意义 ( $P=0.03$ )。在高增殖指数组 ( $Ki-67 > 10\%$ ) 中, Let-7c 的表达低于低增殖指数组 ( $Ki-67 \leq 10\%$ )。此外, Let-7c 的表达与乳腺癌的雌孕激素受体状态亦有关, 雌孕激素受体表达阴性组 Let-7c 表达降低 ( $P$  分别为 0.040 和 0.034)。Let-7c 的表达和月经状况、肿块大小、TNM 分期及是否有淋巴结转移无明显相关 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

乳腺癌是严重威胁妇女健康的常见恶性肿瘤, 目前主要的治疗手段是手术、放疗、化疗, 但总生存率并不理想。生物治疗是未来的发展方向, 因此在分子水平阐明乳腺癌的发生发展机制是寻找新的分子治疗靶点的基础。与绝大多数肿瘤一样, 乳腺癌的发生发展也是一个多基因改变的过程。以往的研究大都集中在编码蛋白的癌基因或抑癌基因上, 近

年来新发现的 MiRNA, 不编码蛋白质, 但能够高效调控癌基因或抑癌基因的表达而在肿瘤的发生发展中起着关键的调控作用, MiRNA 长度约为 22 nt, 通过和靶基因 mRNA 部分互补或完全互补结合抑制其翻译或者导致其降解而起到在转录后水平沉默基因表达的作用, 从而调控细胞的分化、生长、发育、增殖、代谢、凋亡等功能。据预测, 一种 MiRNA 可调控多达上百种靶基因的表达<sup>[3]</sup>。而肿瘤的发生和发展正是细胞生长, 凋亡等多个相关基因表达失衡的结果, MiRNA 表达失调, 就有可能引起肿瘤或其他疾病的发生, MiRNA 和肿瘤的关系正在成为目前研究的热点。成熟的 MiRNA 分子长度很短, 传统的 RT-PCR 检测方法无法对其进行逆转录及扩增。本研究采用茎环 RT-PCR 分析 Let-7c 的表达, 从凝胶电泳鉴定图、PCR 产物熔解曲线及扩增曲线可以看出其灵敏度和特异性均良好。

目前人类中已经鉴定的 MiRNA 已有 500 多种, 但真正明确功能的为数不多。目前初步的研究表明多种 MiRNA 和乳腺癌有关, 如 mir-10b 在高

侵袭性乳腺癌中升高,和乳腺癌的侵袭转移能力有关<sup>[4]</sup>,mir-21和乳腺癌淋巴结转移相关<sup>[5]</sup>,mir-125a和mir-125b在乳腺癌细胞中能够调控靶基因Her-2的表达<sup>[6]</sup>。2005年Iorio等<sup>[5]</sup>用微阵列芯片第一次从乳腺癌组织中筛选出在乳腺癌异常表达的MiRNAs谱,发现有29条MiRNA在乳腺癌中表达失调,其中17条表达上调,其中部分MiRNA的表达失调和临床病理特征明显相关,Let-7c是其中差异表达最明显的几条MiRNA之一,提示其与乳腺癌的发生发展密切相关。本研究用茎环RT-PCR技术检测了40例乳腺浸润性导管癌组织中Let-7c的相对表达量,证实了Let-7c在乳腺浸润性导管癌中表达明显下调,且高增殖指数组Let-7c的表达量相对较低。let-7家族在多种肿瘤中均表达下调,2004年Takamizawa等<sup>[7]</sup>首先发现在人类肺癌中Let-7表达下调,同时提示患者预后较差,生存期短。上调Let-7表达水平时,增强型人肺腺癌细胞株A549的生长受抑制,而Let-7的作用机制目前仍不明确。2005年Johnson等<sup>[1]</sup>首先证实在肺癌中,Let-7对癌基因RAS呈负向调控,RAS基因呈现过度表达。在人类肿瘤里,RAS通常是突变的,并发现了人类RAS基因的3'-UTRs具有多个假定的Let-7互补位点<sup>[8]</sup>,表明与其功能相关。同样在结肠癌组织中Let-7表达下调,在结肠癌细胞株中高表达Let-7,RAS蛋白表达水平下降,癌细胞增殖受到抑制<sup>[9]</sup>,进一步证实Let-7可以通过负向调节RAS癌基因,进而抑制肿瘤细胞的增殖和代谢<sup>[10]</sup>。一种MiRNA往往可调控多种靶基因的表达<sup>[3]</sup>,最新研究发现Let-7可以调控HMGA2基因的表达,HMGA2基因3'-UTRs同样具有多个假定的Let-7互补位点,在高表达HMGA2的HepG2细胞株中转染外源性Let-7前体,HMGA2的表达出现明显下调<sup>[11]</sup>;而且内源性Let-7同样可以抑制HMGA2的表达,在内源性Let-7高表达的HeLa细胞中转染Let-7抑制剂,HMGA2蛋白出现高表达<sup>[11]</sup>。Let-7的作用靶点及途径还有待于更深入的研究,以更好地通过分子生物学途径干预肿瘤的发生、发展。

本研究结果显示Let-7c的表达与乳腺癌的雌孕激素受体状态亦有关,雌孕激素受体表达阴性组Let-7c表达降低。雌孕激素受体的表达是一个独立的预后因素,不受淋巴结转移、绝经状况、临床分期

的影响。ER阳性者,癌细胞分化程度高,淋巴结转移率低,总生存率高,对内分泌治疗敏感。Let-7c与雌孕激素受体之间的相互作用目前尚不明确,能否通过Let-7c的途径来调控雌孕激素受体的表达还有待于进一步的深入研究。通过对Let-7c及Let-7家族的深入研究,了解其功能及作用途径,或许可以找到乳腺癌治疗新的靶标,有助于提高乳腺癌的早期诊断率和靶向治疗的准确性。

#### [参考文献]

- [1] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the Let-7 microRNA family [J]. *Cell*, 2005, 120: 635-647.
- [2] Tang F, Hajkova P, Barton S C, Lao K, Surani M A. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e9.
- [3] Brennecke J, Stark A, Russell R B, Cohen S M. Principles of microRNA-target recognition [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3: e85.
- [4] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449: 682-688.
- [5] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065-7070.
- [6] Scott G K, Goga A, Bhaumik D, Berger C E, Sullivan C S, Benz C C. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 1479-1486.
- [7] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the Let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened post-operative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 3753-3756.
- [8] Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 459-465.
- [9] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 903-906.
- [10] Jérôme T, Laurie P, Louis B, Pierre C. Enjoy the silence: the story of Let-7 microRNA and cancer [J]. *Curr Genomics*, 2007, 8: 229-233.
- [11] Shell S, Park S M, Radjabi A R, Schickel R, Kistner E O, Jewell D A, et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 11400-11405.

[本文编辑] 尹 茶