

Let-7c 及其前体在肺癌中的表达

陈波¹⁾, 卢敏南¹⁾, 王熙才²⁾, 吴疆¹⁾, 吴锡南¹⁾, 何越峰¹⁾

(1) 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第三附属医院, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 探讨 Let-7c 及其前体 Pri-let-7c 在肺癌中的表达特征. **方法** 选择 47 例肺癌患者的肺癌组织和癌旁正常肺组织, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测基因表达量. **结果** Pri-let-7c 在癌组织中的相对表达量为 (13.69 ± 0.80) , 显著低于癌旁正常组织的 (14.13 ± 0.66) ($P < 0.05$), 而 Let-7c 表达无显著变化. 肺癌组织中 Let-7c 与 MRP 成正相关 ($P < 0.05$), 与淋巴结转移成负相关 ($P < 0.05$), Pri-let-7c 的表达与 GSTP π 及淋巴结转移均成负相关 ($P < 0.05$). **结论** Let-7c 及其前体 Pri-let-7c 在肺组织表达并不一致, 但与肺癌密切相关.

[关键词] 肺癌; let-7c; pri-let-7c

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 09 - 0020 - 03

Expression Characteristics of Let-7c and Its Precursor in Lung Cancer

CHEN Bo¹⁾, LU Min - nan¹⁾, WANG Xi - cai²⁾, WU Jiang¹⁾, WU Xi - nan¹⁾, HE Yue - feng¹⁾

(1) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression characteristics of Let-7c and its precursor pri-let-7c in lung cancer. **Methods** Forty-seven patients with lung cancer were randomly selected and their cancer tissues and adjacent normal tissues were collected. Total RNA was extracted using TRIzol reagent and relative gene expression levels were detected using real-time quantitative PCR. **Results** Pri-Let-7c relative expression level in cancer tissues is significantly lower than in adjacent normal tissues (13.69 ± 0.80 vs. 14.13 ± 0.66 , $P = 0.01$) whereas Let-7c expression was not significant changed. There were significant positive correlation between the expression of Let-7c gene and MRP gene ($r = 0.46$, $P = 0.01$) and significant negative correlation between the expression of Let-7c gene and lymph node metastasis ($r = -0.35$, $P = 0.02$), and significant negative correlations of Pri-Let-7c expression with GSTP π ($r = -0.45$, $P = 0.01$) and lymph node metastasis ($r = -0.32$, $P = 0.03$). **Conclusion** The expression levels of Let-7c and its precursor Pri-Let-7c were not consistent in the lung tissues, but they were closely related with lung cancer.

[Key words] Lung cancer; Let-7c; Pri-Let-7c

miRNAs 是近来发现的一类重要分子, 由前体 RNA 剪切后成为成熟的 22nt miRNA, 成熟体通过降解 mRNA 或是阻碍 mRNA 的翻译来调节目标基因的表达, miRNAs 与多种疾病的发生密切相关^[1].

Let-7 是一个重要 miRNA 基因家族, 在细胞生长、增殖等方面具有重要作用^[2-4], 其中关于 Let-7a 和 Let-7b 的研究较多, 课题组前期发现它们与肺癌多个临床指标相关^[5]. Let-7c 在患者肺癌组织中的

[基金项目] 云南省卫生厅科研基金资助项目 (2012WS0041)

[作者简介] 陈波 (1981~), 男, 云南永胜县人, 理学硕士, 助理实验师, 主要从事分子生物学工作. 卢敏南与陈波对本文有同等贡献.

[通讯作者] 何越峰. E-mail:heyuefeng@gmail.com

表达仅 Fassina A 等进行了研究^[4], 而 Pri-Let-7c 在肺癌组织中的表达和成熟体之间的关系却未见文献报道. 本研究探讨 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在肺癌组织中的表达情况及表达关系.

1 材料与方法

1.1 组织收集保存

在取得昆明医科大学伦理委员会批准以及患者的知情同意后, 收集昆明医科大学附属第三医院 2010 年 1 月至 2011 年 12 月住院患者外科手术切除的肺癌组织及癌旁的正常组织(癌旁的正常组织离癌组织 5 cm 以上), 取下后 10 min 以内放入预先装有 RNAlater (美国 ambion 公司) 溶液的试管中, 先在 -4°C 浸泡 8 h 后放入 -80°C 冰箱中长期保存. 术后通过查阅病理切片记录确认组织病理类型, 成功收集 14 例鳞癌组织和 33 例腺癌组织. 通过病人的病历收集年龄、性别、吸烟、饮酒、TNM 分期以及谷胱甘肽 S 转移酶 (GST π)、多药耐药基因蛋白 (P-Gp)、拓扑异构酶 II (TOPO II)、肺耐药蛋白 (LRP)、多药耐药基因 (MRP)、P53 抑癌基因、细胞增殖标记 (Ki-67) 等免疫组织化学方面的资料.

1.2 RNA 的提取和荧光定量 PCR

利用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司) 试剂提取组织总 RNA, 然后用 NCode EXPRESS SYBR GreenER miRNA qRT-PCR Kit (A11193-052) 进行逆转录, 以上按说明书操作. 荧光定量仪器为 ABI7900HT (美国 ABI 公司), 引物和方法参考文献记录^[4,6,7], 对 3 个基因分别进行 SYBR Green 荧光定量 PCR, 以 U6 作为内参来检测其在正常组织和肺癌组织中的相对表达量, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法表示基因在组织中的相对表达量.

1.3 统计学处理

将数据核对后录入数据库利用 SPSS 统计, RNA 的表达呈偏态分布, 通过对数转换后呈正态分布, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间的比较用 t 检验, 多组计量资料采用方差分析, 利用 Spearman 等级相关分析组织中基因的相对表达与 TNM 分期以及谷胱甘肽 S 转移酶 (GST π)、多药耐药基因蛋白 (P-Gp)、拓扑异构酶 II (TOPO II)、肺耐药蛋白 (LRP)、多药耐药基因 (MRP)、P53 抑癌基因、细胞增殖标记 (Ki-67) 等之间的关联性.

2 结果

2.1 病例的基本情况

共收集 47 例样本, 其基本情况为: 民族均为汉族; 组织类型腺癌 33 例, 鳞癌 14 例; 年龄最大 71 岁最小 32 岁, 平均 (54.91 ± 9.62) 岁; 男 32 例, 女 15 例; 吸烟 29 例占 62%; 饮酒 22 例占 47%; 分化程度为: 低分化 18 例, 中分化 28 例, 高分化 1 例; GST π : 5 例 (-)、15 例 (+)、9 例 (++)、3 例 (+++); PgP: 7 例 (-)、14 例 (+)、9 例 (++)、2 例 (+++); TOPO II: 6 例 (-)、20 例 (+)、6 例 (++)、LRP: 2 例 (-)、14 例 (+)、13 例 (++)、3 例 (+++); MRP: 4 例 (-)、13 例 (+)、15 例 (++)、P53: 9 例 (-)、15 例 (+)、7 例 (++)、1 例 (+++); Ki67: 5% ~ 90%, 平均数为 32.67%.

2.2 Let-7 及其前体 Pri-Let-7c 在不同肺癌组织和癌旁正常组织中的表达情况

结果显示与癌旁正常组织相比, Pri-Let-7c 在肺癌组织中表达显著降低 ($P < 0.05$), 而成熟体 Let-7c 在肺癌组织和癌旁正常组织中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

在对组织类型分类得到的 14 例鳞癌和 33 例腺癌组织及其癌旁正常组织进行的分层分析表明, 无论癌症类型是否存在差别 Pri-Let-7c 的表达要显著低于癌旁正常组织 ($F = 4.47$, $P = 0.01$).

2.3 肺癌组织中 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 的表达与临床各指标之间的关系

通过 Spearman 等级相关分析肺癌组织中 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 的表达与 TNM 分期以及 GSTP π 、PGP、TOPO II、LRP、MRP、P53、KI67 的相关性分析表明淋巴结转移与 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 表达呈负相关, 而 Pri-Let-7c 与 GSTP π 和 ki67 的表达呈负相关, Let-7c 与 MRP 呈负相关, 见表 2.

2.4 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在组织中的表达关系

Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在肺癌组织和癌旁正常组织中的表达均没有关联 ($P > 0.05$).

2.5 Dicer 与 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在癌旁正常组织和肺癌组织中的表达关系

通过 Spearman 等级相关分析癌旁正常组织和肺癌组织中 Let-7c 与其目标基因 Dicer 的表达发现, 在癌旁正常组织中 Let-7c 与其目标基因 Dicer 表达量呈负相关, 而在肺癌组织中则不存在相关性, 见表 3.

表 1 Let-7 及其前体在肺癌组织和癌旁正常组织中的表达情况

Tab. 1 The expression levels of Let-7c and its precursor Pri-Let-7c in the lung tissues and adjacent normal tissues

基 因	正常组织	癌组织	<i>t</i>	<i>P</i>
Pri-Let-7c	14.13 ± 0.66	13.69 ± 0.80	2.85	0.01
Let-7c	15.14 ± 2.10	15.29 ± 2.30	0.27	0.80

表 2 肺癌组织中 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 的表达与临床各指标之间的关系

Tab. 2 Correlations between both the expression levels of Let-7c and its precursor Pri-Let-7c in the lung tissues and clinical indicators

参 数	<i>rs</i>	<i>P</i>
Pri-Let-7c 和淋巴结转移 (N)	-0.32	0.03
Pri-Let-7c 和 GSTP π	-0.45	0.01
Pri-Let-7c 和 ki67	-0.37	0.05
Let-7c 和肿瘤大小状态 (T)	-0.25	0.09
Let-7c 和淋巴结转移 (N)	-0.35	0.02
Let-7c 和 MRP	0.46	0.01

注: Spearman 相关 *p* 均值大于 0.10 的未在表中列出。

表 3 Dicer 与 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在癌旁正常组织和肺癌组织中的表达关系

Tab. 3 Correlations between dicer and both the expression levels of Let-7c and its precursor Pri-Let-7c in the lung tissues and adjacent normal tissues

基 因	组织类型	Spearman 相关	
		<i>r</i>	<i>P</i>
Let-7c	肺癌组织	0.13	0.37
	癌旁正常组织	-0.32	0.03

3 讨论

miRNAs 是近来发现的一类重要分子, 它由前体 RNA 剪切后成为成熟的 22nt miRNA, 成熟体通过降解 mRNA 或是阻碍 mRNA 的翻译调节目标基因, 与多种疾病的发生密切相关^[1]。Let-7c 作为 Let-7 基因家族中的一员, 在细胞生长、增殖等方面具有重要作用^[2-4], 本研究表明 Let-7c 在肺癌组织中的表达和正常组织无显著差异, 与之前 Fassina A 等的研究结果不完全一致, 他们发现 Let-7c 的表达升高, 本研究一共有 47 例样本高于 Fassina A 等的研究所用的 31 例样本量^[4], 因此笔者认为本研究的结果更能反应 Let-7c 在肺癌中的表达。Pri-Let-7c 在肺癌组织中的表达和成熟体之间的关系未见报道, 本研究发现 Pri-Let-7c 在肺癌组织中

的表达显著低于癌旁正常组织, 并与 GSTP π 、淋巴转移等临床各指标相关, 这说明其可能在肺癌的发生过程中起重要作用。Pri-Let-7c 与 Let-7c 在肺癌组织和癌旁正常组织中的表达均没有关联, 这可能是 Pri-Let-7c 异常降解的结果^[8-10]。Dicer 是 Let-7 家族常见的调控目标基因, 其表达与 Let-7c 的表达在正常组织中也呈现出负相关, 这与先前研究结果一致^[9]。本研究分析了 Let-7c 及其前体 Pri-Let-7c 在肺癌组织中的表达量, 同时分析了它们与 TNM 分期以及 GSTP π 、PGP、TOPO II、LRP、MRP、p53、Ki67 的关系, 这为肺癌的研究提供了线索。

[参考文献]

- [1] WINTER J, JUNG S, KELLER S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(3): 228 - 234.
- [2] YU F, YAO H, ZHU P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131(6): 1109 - 1123.
- [3] SAMPSON V B, RONG N H, HAN J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9762 - 9770.
- [4] FASSINA A, CAPPELLESSO R, FASSAN M. Classification of non-small cell lung carcinoma in transthoracic needle specimens using microRNA expression profiling [J]. Chest, 2011, 140(5): 1305 - 1311.
- [5] 喻箴, 杨凯云, 李光剑, 等. Let-7 与 Dicer 基因在肺癌组织和癌旁正常组织中表达的比较 [J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(7): 610 - 612.
- [6] KUEHBACHER A, URBICH C, ZEIHNER A M, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis [J]. Circ Res, 2007, 101(1): 59 - 68.
- [7] JIANG J, LEE E J, GUSEV Y, et al. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(17): 5394 - 5403.
- [8] GRAF R, MUNSCHAUER M, MASTROBUONI G, et al. Identification of LIN28B-bound mRNAs reveals features of target recognition and regulation [J]. RNA Biol, 2013, 10(7): 1146 - 1159.
- [9] HEO I, JOO C, KIM Y K, et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation [J]. Cell, 2009, 138(4): 696 - 708.
- [10] CHANG H M, TRIBOULET R, THORNTON J E, et al. A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway [J]. Nature, 2013, 497(7448): 244 - 248.

(2014-05-02 收稿)