

· 论 著 ·

## let-7a 在胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达及其对人胃癌细胞凋亡的影响

朱益民<sup>#</sup>, 刘志明<sup>△</sup>, 历成杰, 白卫兵

(广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 研究 let-7a 在胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达及 let-7a 在体外实验中对胃癌细胞凋亡的影响。方法 原位杂交法检测组织芯片上 11 例正常胃黏膜、17 例慢性萎缩性胃炎、52 例胃癌组织中 let-7a 的表达, 分析三者阳性率及表达强度差异性。并将 let-7a 用重组慢病毒转导入人胃癌 SGC-7901 细胞, 采用流式细胞仪检测 let-7a 对胃癌细胞凋亡的影响。结果 (1) let-7a 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的阳性表达率分别为 90.9%、88.2%、82.7%, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 而表达强度随着胃黏膜癌变的演进逐渐减弱, 采用有序分组资料的线性趋势检验分析 ( $P<0.05$ )。 (2) 流式细胞仪对凋亡分析显示, let-7a 对 SGC-7901 的凋亡有明显的促进作用 ( $P<0.01$ )。结论 let-7a 表达的减弱与胃黏膜癌变演进过程相关; let-7a 能够促进 SGC-7901 细胞的凋亡, 提示 let-7a 能有效抑制胃癌细胞。

**关键词:** miRNA; 胃癌; 组织微阵列; 原位杂交; 凋亡**中图分类号:** R735.2; R730.54**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)08-0921-03

### Study of in situ expression of let-7a in the gastric mucosa cancerization tissue array and the effect of let-7a on apoptosis of human gastric carcinoma cell line

ZHU Yi-min<sup>#</sup>, LIU Zhi-ming<sup>△</sup>, LI Cheng-jie, et al.

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of let-7a micro RNA in the human gastric mucosa cancerization progression tissue array, and study the effects of the let-7a on apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. **Methods** Situ hybridization was used to detect the expression of let-7a in gastric mucosa cancerization progression tissue microarray containing 11 cases of normal gastric tissue, 17 cases of chronic atrophic gastritis (atypical hyperplasia) and 52 cases of gastric carcinoma. The let-7a was transferred to the human gastric carcinoma cell lines SGC-7901 by recombinant lentiviruses which carrying let-7a and cells apoptosis were analysed for the infected cells by flow cytometry (FCM). **Results** (1) The positive cases of let-7a expression in normal gastric tissue, chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma were 10, 15, and 43 respectively. There was no significant difference of positive rate among the three groups. However, the degrees of let-7a expression in the groups were closely related to the progression of gastric mucosa cancerization. (2) Flow cytometry based cell apoptosis assays showed that overexpression of let-7a could increase apoptosis in SGC-7901 cells ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The decrease of let-7a is related to progression of gastric mucosa cancerization. let-7a can promote apoptosis in SGC-7901 cells. It suggests that let-7a can effectively inhibit gastric carcinoma.

**Key words:** miRNA; gastric carcinoma; tissue microarray; situ hybridization; apoptosis

微小 RNA (micro RNA, miRNA) 普遍存在于多细胞生物中, 约占整个基因组基因总数 2% 左右<sup>[1]</sup>。miRNA 是一种内源性的、小的、非编码 RNA 分子, 长约 22 个核苷酸, 调控转录后的翻译, 并已被证实参与和调控了包括时序发育、细胞凋亡、脂肪代谢、神经元发育、细胞分化、激素分泌等在内的多种生理过程。2001 年才认识到 miRNA 兼有肿瘤抑制基因和癌基因的功能, 在肿瘤的诊断和预后中 miRNA 可以补充其他基因组和蛋白组的生物标记<sup>[2-3]</sup>。let-7 (let-7) 是较早被发现的有肿瘤抑制作用的 miRNA, let-7 是其家族中的一员。慢性萎缩性胃炎是公认的癌前病变, 本研究利用组织微阵列结合原位杂交技术检测 let-7a 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎及胃癌组织中的表达, 分析 let-7a 在 3 种组织中阳性表达率的差异性及其表达强度与正常胃黏膜→慢性萎缩性胃炎→胃癌这一病变演进过程的关系。本科还从正常组织中克隆 let-7a 全长基因, 并将其连接到了慢病毒载体 (Lentiviral vector), 利用重组慢病毒将 let-7a 转导入胃癌 SGC-7901 细胞, 研究转基因前后 SGC-7901

细胞凋亡率的变化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 组织、细胞及质粒来源** 所使用的组织芯片是陕西超英生物科技有限公司产品, 芯片代码为 CC01-01-08, 含 80 个组织点, 排列成 8 行 10 列, 点样直径 1.5 mm, 其中正常胃黏膜 11 个点、慢性萎缩性胃炎 (伴非典型性增生) 17 个点、胃癌 52 个点 (腺癌 42 例、鳞癌 8 例、印戒细胞癌 2 例)。同时收集各种组织的一般临床资料。正常胃黏膜标本中男 9 例、女 2 例, 平均年龄 58 岁; 慢性萎缩胃炎标本中男 12 例、女 5 例, 平均年龄 58.5 岁; 胃癌标本中男 41 例、女 11 例, 平均年龄 57.8 岁。人胚胎肾上皮细胞 293 T、人胃癌细胞系 SGC-7901 均购自中国科学院上海细胞库。质粒 Pwpxl-MOD2、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 由上海交通大学刘天津博士惠赠; let-7a 表达质粒 Pwpxl-MOD2-let-7a 由本实验室构建。

**1.1.2 试剂盒、酶、试剂及引物来源** let-7a 探针购自丹麦

<sup>#</sup> 广西医科大学研究生学院在读博士生。 <sup>△</sup> 通讯作者, 电话: 13152663170; E-mail: zym330422@163.com。

Exoqin 公司,抗地高辛-辣根过氧化物酶复合物检测试剂盒 (Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments) 购于 Roche 公司; *let-7a* 特异性寡核苷酸引物由上海生物工程技术公司设计合成,上游引物序列 AGGATCCAAAGGTGGTGGTAAGAGGGT-GAT,下游引物序列 AGTCGAC ATAAGACAAGAAG-CAAAAGGTTT。胎牛血清、RPMI1640 培养液购于美国 Gibco 公司。总 RNA 提取试剂 Trizol 购于 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒购于 Promega 公司。限制性内切酶、Real-Time PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。T4 连接酶购自 TOYOBO 公司,DNA 抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,AnnexinV/PI 试剂盒购自南京凯基生物公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 原位杂交检测 *let-7a* 在组织微阵列中的表达** 实验方法:4  $\mu\text{m}$  厚的组织微阵列切片脱蜡,PBS/DEPC 水洗后,经 10 mg/L 胃蛋白酶 K 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 28 min,过梯度乙醇(70%~80%~95%~100%)室温凉干,0.2 mol/L HCl 于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 20~30 min 增加组织通透性,4%多聚甲醛(0.1 mol/L PBS 溶解)室温条件下固定 10 min,0.1 mol/L TEA 缓冲液 I [0.1 mol/L 三乙醇胺与乙酸酐混合液,浓度 0.25%(体积比)]和 TEA 缓冲液 II [0.1 mol/L 三乙醇胺与乙酸酐混合液,浓度 0.5%(体积比)]杂交前处理以增加组织阳性杂交的强度。杂交:探针 Has-*let-7a* 用杂交液稀释至 20 nmol,滴加于组织芯片上,39~45  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅内杂交 18 h。杂交后用 TBS 溶液冲洗 3 次,每次 10 min,封闭液封闭 25 min(封闭非特异的抗体结合位点)。杂交后采用 Anti-Digoxigenin-POD 检测地高辛探针与 miRNA 结合复合物,TSA 放大系统增强原位杂交反应的阳性信号,NBT/BCIP 显色,显微镜下控制显色反应,加核快红复染 3 min,中性树脂胶封片。

阳性对照和阴性对照:看家基因  $\beta$ -actin 的寡核苷酸探针作为每次杂交的阳性对照,不加探针的预杂交液作每次实验阴性对照。结果判断:光学显微镜下对 *let-7a* 在组织微阵列切片中每一组织点的表达行综合观察判断。(1)根据阳性染色强度判断:细胞无染色为 0 分;细胞呈浅蓝色记 1 分;细胞染成蓝色并无背景染色,为中等阳性,记 2 分;细胞呈紫色,无背景着色,为强阳性,记 3 分。(2)根据阳性细胞数计分:无阳性细胞计 0 分;阳性细胞数小于或等于 30%计 1 分;30%~70%计 2 分;阳性细胞数 70%以上计 3 分。取两种计分结果的乘积,0 分为阴性,1、2、3、4、6、9 分为阳性,其中 1、2 分计作 $\pm$ ,3、4 分计作 $+$ ,6 分计作 $++$ ,9 分计作 $+++$ 。

**1.2.2 重组慢病毒介导的基因转移** 用磷酸钙沉淀法将 Pwpxl-MOD2-*let-7a*、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 共转染包装细胞 293T,获得携带目的基因 *let-7a* 和绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的重组病毒,同时共转染 Pwpxl-MOD2、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 进另一组 293T 作为阴性对照。按文献[7]方法获取重组慢病毒后用它们分别感染胃癌 SGC-7901 细胞系,分别获得过表达 *let-7a* 的 SGC-7901-Pwpxl-MOD2-*let-7a* 细胞株(实验组)和转染了空载体(仅表达 GFP)的 SGC-7901-Pwpxl-MOD2 细胞株(阴性对照组),亲代 SGC-7901 细胞作为本实验的空白对照组。

### 1.2.3 胃癌细胞株 *let-7a* 基因表达检测

**1.2.3.1 重组慢病毒介导基因转导效率的检测** 重组病毒感染 48 h 后,将培养皿放在荧光显微镜下,观察有绿色荧光的细胞数,判断感染的效率。同时可用流式细胞仪 (FCM) 检测 GFP 阳性细胞百分数,验证慢病毒感染效率(转基因效率)。

**1.2.3.2 采用实时定量 PCR(qReal time-PCR)检测 3 组细胞中目的基因的表达** 重组病毒感染细胞 72 h 后收集靶细胞,按 Trizol Reagent 说明书的步骤,抽提各组细胞的 Total RNA,并利用 ReverTra Ace- $\alpha$  First Strand cDNA Synthesis Kit,经 RT-PCR 生成相应的 cDNA,逆转录引物:oligo dT 和 *let-7a*PRT:GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACT A,经 RT-PCR 生成相应的 cDNA,以各组 cDNA 作为模板,利用两步法进行 qReal time-PCR(qReal time-PCR 仪为:Eppendorf RealPlex4,Eppendorf Co,LTD)。采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系,SYBR Green 荧光染料 10  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  的引物 1  $\mu\text{L}$ ,cDNA 5  $\mu\text{L}$ , $\text{H}_2\text{O}$  4  $\mu\text{L}$ 。反应条件:退火温度为 54  $^{\circ}\text{C}$ ,延伸温度为 45  $^{\circ}\text{C}$ ,共 40 个循环,读取 Ct(Cycle threshold)值。据相对定量法(mRNA 的相对变化量公式  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ )计算目标片段的扩增比例。各样本重复 3 次,以 18S RNA 作为内参。空白对照组以同样的方法作检测。

**1.3 *let-7a* 对胃癌细胞凋亡影响的体外实验** 一式三份  $4 \times 10^5$  个对数生长期的实验组、阴性对照组、空白对照组细胞分别培养在 6 孔的培养平板中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,按 AnnexinV/PI 试剂盒说明进行凋亡检测,AnnexinV(+),PI(-)判断为早期凋亡细胞;AnnexinV(+),PI(+)为晚期凋亡细胞和坏死细胞;AnnexinV(-),PI(-)为成活细胞;AnnexinV(-),PI(+)为损伤细胞。实验重复 3 次。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS11.5 软件中的  $\chi^2$  检验分析 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中阳性表达率的差异性;采用有序分组资料的线性趋势检验(Chi-Square and Correlations Test)分析 *let-7a* 在 3 种组织中的表达强度与正常胃黏膜 $\rightarrow$ 慢性萎缩性胃炎 $\rightarrow$ 胃癌这一病变演进过程的关系,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 软件作统计学处理,样本均数的比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的原位表达** 在正常胃组织黏膜上皮细胞浆、核及腺体细胞浆、核有阳性染色。在炎性组织及增生组织中,增生的黏膜上皮细胞核、腺体细胞核、浆均有着色,部分淋巴细胞亦有着色。在胃癌组织中以癌细胞胞浆着色为主,部分癌细胞核亦有着色。阴性对照:背景干净,无蓝紫色着色;阳性对照:非特异性着色少,背景清晰。*let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的原位表达的结果见表 1、插图 I 图 1。*let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织原位表达中的阳性率分别为 90.9%、88.2%、82.7%。采用  $\chi^2$  检验分析比较发现 *let-7a* 在 3 种组织中的阳性表达率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 *let-7a* 表达强度与胃黏膜癌变演进的关系** *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的原位表达强度经采用有序分组资料的线性趋势检验, $P = 0.008$ 。*let-7a* 在胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达强度呈线性关系,即随着胃黏膜癌变的演进,*let-7a* 在胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达强度逐渐消减。

**2.3 基因转导效率的检测结果** 重组慢病毒感染靶细胞 48 h 后,放在荧光显微镜下几乎 100%细胞表达 GFP,FCM 检测靶细胞 GFP 表达,其阳性率达 98%以上。

**2.4 采用 qReal time-PCR 检测 3 组细胞中 *let-7a* 的表达结果** qReal time-PCR 检测各样本:将实验组、空载体组、空白对照组

细胞采用 Real Time PCR 检测后,读取各组的 Ct 值。 $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{实验组 } let-7a) - Ct(\text{实验组 18S RNA})] - [Ct(\text{空白对照组 } let-7a) - Ct(\text{空白对照组 18S RNA})]$ ,然后用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算,表示实验组 *let-7a* 基因的表达与空白对照组的相对变化倍数,同法计算空载体组 *let-7a* 基因的表达与空白对照组的相对变化倍数。重组慢病毒介导的 Pwpxl-MOD2-*let-7a* 转入胃癌 SGC-7901 细胞后,*let-7a* 的表达量明显增高;而阴性对照组(重组慢病毒介导的 Pwpxl-MOD2 转入胃癌 SGC-7901 细胞)和亲代的胃癌 SGC-7901 细胞检测到的 *let-7a* 的表达水平相对较低,见图 2。

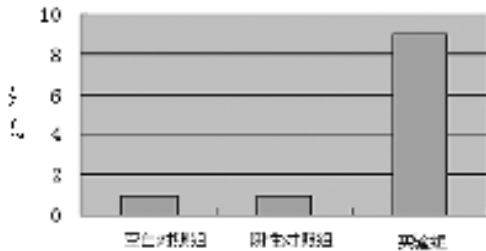
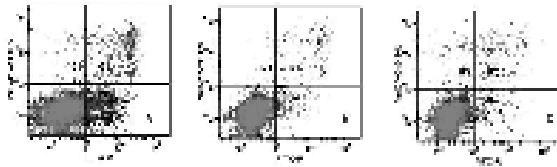


图 2 Real time-PCR 检测 SGC-7901 转染 *let-7a* 后表达量的变化

表 1 *let-7a* 在胃黏膜癌病变演进组织芯片上原位杂交的表达

组别	n	表达结果					阳性率 (%)
		-	±	+	++	+++	
正常胃黏膜	11	1	0	2	8	0	90.9
慢性萎缩性胃炎	17	2	2	7	5	1	88.2
胃癌	52	7	18	18	7	2	86.5

**2.5 *let-7a* 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响** FCM 检测显示 *let-7a* 对 SGC-7901 细胞凋亡有明显的促进作用,转导 *let-7a* 的实验组凋亡率为  $(12.0 \pm 3.1)\%$ ,与空白对照组  $(1.9 \pm 1.0)\%$  相比差异有统计学意义 ( $P=0.002$ ),而阴性对照组  $(2.5 \pm 0.7)\%$  与空白对照组相比差异无统计学意义 ( $P=1.0$ ),见图 3。



A:实验组的凋亡率;B:阴性对照组的凋亡率;C:空白对照组的凋亡率。

图 3 *let-7a* 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

3 讨 论

*let-7a* 是 1993 年被发现的第 2 个 miRNA,成熟 *let-7a* 其长 22 个核苷酸高度保守,提示这一片段是其功能的核心。Johnson 等<sup>[4]</sup> 研究显示 *let-7* 在肺癌中表达低于正常肺组织。Takamizawa 等<sup>[5]</sup> 报道人类肺癌中 *let-7* 经常减少,并且与术后生存期显著相关。通常石蜡块包埋的组织中会丢失部分蛋白/RNA 生物标记,而 miRNA 却因其分子结构短小而不易被 RNA 酶或机械分解<sup>[6]</sup>。miRNA 的序列短而杂交亲和力和特异性差,采用锁定核苷酸技术 (locked nucleic acid, LNA) 可以克服此缺陷<sup>[7]</sup>。本实验采用组织芯片加锁定核苷酸的探针作

原位杂交收到了满意的效果。本实验中 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎和胃癌组织中的阳性表达率差异无统计学意义,有可能是因本实验所采用的组织芯片所包含的正常胃黏膜样本量太小而影响统计的结果。分析比较 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达强度,本研究结果显示,随着胃黏膜癌变的演进,其表达强度逐渐减弱,即 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达逐渐递减。提示 *let-7a* 在正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中的表达变化是一个量变过程,而非质变。由于胃癌组织块包含肿瘤细胞和不少的非肿瘤细胞,实时反转录聚合酶链反应 (real-time qRT-PCR) 检测虽有定量优势,其结果未能完全反映出胃癌细胞中的 *let-7a* 表达情况,原位杂交检测胃癌中 *let-7a*,可以更直观地显示出肿瘤细胞中的表达情况,是了解 miRNA 时序性和组织特异性表达更有效的方法。

在本研究中,重组病毒载体基因转移方法具有极高的转染效果,经 2 个循环的感染,几乎可使 100% 的靶细胞获得目的基因,通过荧光显微镜直接观察有否 GFP 表达从而间接知道靶细胞是否被转染和表达 *let-7a*。本体外研究显示, *let-7a* 能够显著增加 SGC-7901 细胞的凋亡率。细胞凋亡是受基因控制的,是细胞主动参与其自身有序的生理死亡过程,诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤的主要途径<sup>[8]</sup>。提示 *let-7a* 有抑制胃癌细胞 SGC-7901 生长的抗肿瘤作用。

参考文献:

[1] Berezikov E, Guryev V, Vande Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21.

[2] Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 25.

[3] Cho WC, Cheng CH. Oncoproteomics: current trends and future perspectives[J]. Expert Rev Proteomics, 2007, 4: 401.

[4] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family[J]. Cell, 2005, 120: 635.

[5] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res, 2004, 64: 3753.

[6] Lorenzo F, Sempere, Christensen M, et al. Altered micro RNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67 (24): 11615.

[7] Kloosterman WP, Wienholds E, Bruijn E, et al. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA 2 modified oligonucleotide probes[J]. Nat Methods, 2006, 3(1): 27.

[8] 邓碧, 叶琳, 王驰, 等. 脂质体阿霉素诱导人喉癌 HEP-2 细胞株凋亡的研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2318.