

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.005

· 基础研究 ·

## 外泌体介导的 Let-7a 通过下调 MYC 表达抑制三阴性乳腺癌细胞的恶性生物学行为

李封<sup>a</sup>, 张艳<sup>b</sup>, 张琼<sup>a</sup>, 陶劲<sup>a</sup>, 白殊同<sup>c</sup>, 宋娜<sup>a</sup>, 孙明令<sup>a</sup>, 段亚亭<sup>b</sup> (重庆市中医院 a. 肿瘤科; b. 妇科; c. 基础实验室, 重庆 400021)

**[摘要]** **目的:** 探讨外泌体(EXO)传输 Let-7a 调控 MYC 基因在三阴性乳腺癌(TNBC)细胞恶性生物学行为中的作用及其机制。**方法:** TNBC 细胞 MDA-MB-231 培养完成后, qPCR 实验检测 TNBC 组织和细胞中 MYC 与 Let-7a mRNA 的表达水平, WB 实验检测 MYC 与 Let-7a 蛋白的表达水平。携 Let-7a 重组慢病毒和敲除 MYC 的 Crisper/Cas-9 系统分别转染 MDA-MB-231 细胞, MTT、Transwell、划痕愈合实验检测 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭和迁移能力。荧光素酶活性实验验证 MYC 和 Let-7a 的作用靶点。分别在野生型和过表达 Let-7a 的 MDA-MB-231 细胞中分离 EXO, 并以透射电镜和 WB 实验鉴定。qPCR、WB、MTT、Transwell 等实验检测两种 EXO 分别和 MDA-MB-231 细胞共孵育后 Let-7a 通过 EXO 影响 MDA-MB-231 细胞的生物学功能。**结果:** Let-7a 与 MYC 在 TNBC 组织和细胞系中表达呈负相关 ( $P < 0.05$ ); MYC 促进 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭, Let-7a 可以抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭 (均  $P < 0.01$ )。Let-7a 通过作用于 MYC 基因的 3'UTR 使其沉默, 从而减少 MYC 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。Let-7a 由 EXO 包裹运输至肿瘤细胞, 进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭能力 ( $P < 0.05$ )。**结论:** EXO 介导的 Let-7a 通过作用于 MYC 基因 3'UTR 区使得 MYC 基因沉默, 从而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 外泌体; Let-7a; MYC; 恶性生物学行为

**[中图分类号]** R392.12; R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)09-0962-07

## Exosome-mediated Let-7a inhibits malignant biological behaviors of triple-negative breast cancer cells by down-regulating MYC expression

LI Feng<sup>a</sup>, ZHANG Yan<sup>b</sup>, ZHANG Qiong<sup>a</sup>, TAO Jin<sup>a</sup>, BAI Shutong<sup>c</sup>, SONG Na<sup>a</sup>, SUN Mingling<sup>a</sup>, DUAN Yating<sup>b</sup> (a. Oncology Department; b. Gynaecology Department; c. Basic Laboratory, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of exosome (EXO) transporting Let-7a to regulate MYC gene in the malignant biological behaviors of triple negative breast cancer (TNBC) cell, and to explore the underlying mechanism. **Methods:** After the completion of cell culture, the gene and protein expressions of MYC and Let-7a in TNBC MDA-MB-231 cells were detected by qPCR and WB, respectively. Recombinant lenti-virus vector carrying Let-7a and Crisper/Cas-9 system with MYC knockdown were transfected into MDA-MB-231 cells; MTT assay, Transwell assay and Scratch healing assay were performed to examine the proliferation, invasion and migration of MDA-MB-231 cells. Luciferase activity assay was performed to validate the binding between MYC and Let-7a. EXO was isolated and identified by transmission electron microscopy and WB assay in wild-type and Let-7a over-expressed MDA-MB-231 cells, respectively. After co-incubation of two types of EXO and MDA-MB-231 cells, the effects of Let-7a on biological behaviors of MDA-MB-231 cells *via* EXO were detected by qPCR, WB, MTT and Transwell etc. **Results:** Let-7a was negatively correlated with MYC in breast cancer tissues and cell lines (all  $P < 0.05$ ); MYC promoted while Let-7a inhibited the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells (all  $P < 0.01$ ); Let-7a silenced MYC by acting on 3'UTR of MYC gene, thereby reducing the expression of MYC protein ( $P < 0.05$ ); Let-7a was enveloped by EXO and transported to cancer cells, there by inhibiting the proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** EXO some mediated Let-7a silences MYC gene by acting on its 3'UTR region, thus inhibiting the proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells.

**[Key words]** triple negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-231 cell; exosome (EXO); Let-7a; MYC; malignant biological behavior

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(9): 962-968. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.09.005]

**[基金项目]** 国家中医药管理局基金资助项目(No. 20140814)。Project supported by the Grants from National Administration Bureau of Chinese Medicine and Herbs (No. 20140814)

**[作者简介]** 李封(1986-), 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤靶向治疗的研究, E-mail: xin29209234@163.com

**[通信作者]** 张艳(ZHANG Yan, corresponding author), 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤靶向治疗的研究, E-mail: 2369475216@qq.com

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)占乳腺癌发病总数的15%~20%<sup>[1]</sup>,患者多为年轻女性,组织学分级高,较其他乳腺癌亚型更具侵袭性,死亡风险显著高于其他分型乳腺癌患者<sup>[2-3]</sup>。而目前缺乏有效治疗TNBC的药物,其靶向治疗更是目前研究的热点和难点。有研究<sup>[4]</sup>表明,外泌体(exosome,EXO)传输miRNA可能是miRNA调控基因表达的关键步骤。外泌体通过细胞融合或者内吞作用将其内容物释放到受体细胞中,其携带的核酸分子会在受体细胞内进行转录和翻译,从而调控受体细胞靶基因的表达<sup>[5]</sup>。MYC作为一个重要的肿瘤相关基因受到具有抑癌基因作用的miRNA的转录后调控。Let-7a通过调控原癌基因(如KRAS、MYC)和细胞周期相关基因(cyclinD1/2)的表达来调控细胞周期及细胞分化,在肿瘤的发生发展中起到重要的作用。但是,EXO、Let-7a以及MYC在TNBC发生发展过程中的调控作用目前尚未见报道。因此,本研究通过分析TNBC临床样本中的基因表达情况,并通过构建基因敲除和过表达的乳腺癌细胞系,探索EXO传输Let-7a调控MYC基因在TNBC发生发展中的作用,为TNBC的靶向干预提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样本、细胞株及主要试剂

收集2018年1月至2018年12月重庆市中医院乳腺癌患者组织样本14例,均经病理学和免疫组织化学检查证实为TNBC,患者年龄27~66岁,平均(47.7±10.3)岁,均为女性;临床TNM分期:I期6例、II期6例、III期1例、IV期1例。所有患者均签署了使用组织进行乳腺癌综合实验的知情同意书,研究方案获得所在医院伦理委员会批准。组织活检后立即将组织样品在液氮中冷冻并储存在-70℃直至使用。

人乳腺癌细胞系MCF-7、T47D、sk-br-3和MDA-MB-231购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所(中国上海)。

胎牛血清、TRIzol试剂均购于美国Thermo Fisher Scientific公司,DMEM培养基购于美国Hyclone公司,SYBR Primix Ex Taq™实时检测试剂盒购于中国康为世纪生物科技有限公司,MYC、CD9、CD81抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,山羊抗兔或抗小鼠二抗购于美国Bioworld Technology公司,聚乙烯亚胺转染试剂购自美国Sigma-Aldrich公司。pWPXLd质粒,psPAX2和pMD.2G质粒为本实验室保存质粒。

### 1.2 细胞培养

将人乳腺癌细胞系MCF-7、T47D、sk-br-3和MDA-MB-231在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下,在DMEM培养基中添加10%胎牛血清进行培养。

### 1.3 qPCR实验检测TNBC组织和细胞中MYC与Let-7a mRNA的表达水平

使用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA,并通过使用逆转录酶将1 μg RNA逆转录为cDNA,反应条件为:40℃变性60 min,25℃、5 min、85℃5 min。然后,取2 μl逆转录产物进行PCR检测,采用GAPDH作为内参,反应条件为:95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸10 s,进行35个循环。引物序列:MYC F为5'-TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG-3',R为5'-CTACCTGCACTATAAGCACTTTA-3';Let-7a F为5'-AACGCGTGACAGAGAGCGTCCTATGC-3',R为5'-AAGCTTCAAAGACACATGGGAGATCC-3';GAPDH F为5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAA CG-3',R为5'-CAAAGTTGTCAATGATGHACC-3'。随后,按照SYBR Primix Ex Taq™说明书进行qPCR,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算MYC与Let-7a mRNA的表达水平。实验重复3次。

### 1.4 WB实验检测TNBC组织和细胞中MYC与Let-7a蛋白的表达水平

在含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中裂解细胞。提取组织或细胞总蛋白,通过12% SDS-PAGE分离蛋白质。电泳后将蛋白质转移至PVDF膜,在5%脱脂乳中封闭,并在4℃下与MYC、CD9、CD81抗体一抗(1:500)孵育过夜。用TBST洗涤3次后,将膜与HRP缀合的山羊抗兔或抗小鼠二抗(1:1 000)在室温下孵育2 h。GAPDH用作加载对照。实验重复3次。

### 1.5 慢病毒转染MDA-MB-231细胞

待细胞汇合度达到70%~90%时,利用聚乙烯亚胺转染试剂转染HEK-293T细胞产生慢病毒颗粒。将pWPXLd-Let-7a慢病毒质粒和2个包装质粒psPAX2和pMD.2G加入10 cm培养皿培养的HEK-293 T细胞中,比例为3:1:4,总量为24 μg。在转染48 h后收获含有慢病毒的上清液,并通过0.45 μm过滤器过滤。112 700×g离心2 h进行浓缩,-80℃保存。将MDA-MB-231细胞培养至对数生长期。在六孔板中,向每个孔中加入含有6 μg/ml polybrene和50 μl病毒的新鲜完全培养基。孵育24 h后,用新鲜的全培养基替换。转导5 d后,用含有嘌呤霉素的培养基筛选稳转细胞。

### 1.6 MTT实验检测MDA-MB-231细胞增殖能力

将MDA-MB-231细胞以4×10<sup>3</sup>个细胞/孔接种,20 μl MTT溶液(5 mg/ml)加入各孔中并培养4 h。小

心吸出培养基,向各孔中加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜,将平板置于低速振荡器上振荡直至晶体完全溶解。用酶标仪测量波长 490 nm 处光密度( $D$ )值。实验重复 3 次。

### 1.7 Transwell 小室实验检测 MDA-MB-231 细胞侵袭能力

MDA-MB-231 细胞侵袭的测定在 8  $\mu$ m 孔径聚碳酸酯膜的 24 孔 Boyden 小室中进行。Matrigel 在 2~8  $^{\circ}$ C 过夜融化,将稀释的 25  $\mu$ l Matrigel 加入 Transwell 的小室上方,覆盖整个聚碳酸酯膜,在 37  $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min,使 Matrigel 聚合成胶。在小室上铺上 MDA-MB-231 细胞( $2 \times 10^4$  在 100  $\mu$ l 无血清培养基中),在下室中加入 500  $\mu$ l 的趋化因子,孵育 12 h 后,除去膜上表面的癌细胞。通过多聚甲醛固定膜下表面上的迁移细胞,用结晶紫染色,并在显微镜下计数。实验重复 3 次。

### 1.8 划痕愈合实验检测 MDA-MB-231 细胞迁移能力

将 MDA-MB-231 细胞( $1 \times 10^5$  个细胞)接种在 24 孔板中过夜。第 2 天洗涤细胞并在 1% FBS 培养基中饥饿 16~18 h。当细胞达到汇合时,在每个孔中心用 1 ml 枪头尖端刮擦细胞,用 PBS 洗涤 3 遍,并加入完全培养基。在 24/48 h 拍摄照片,使用 Nikon TMS 倒置显微镜(10 倍放大率)和佳能 EOS 相机拍摄照片。通过 ImageJ 软件确定无细胞区域。实验重复 3 次。

### 1.9 荧光素酶活性实验验证 MYC 和 Let-7a 的作用靶点

对于荧光素酶报告基因测定,将 MDA-MB-231 细胞铺在 24 孔板中并与 50 nmol/L 的 Conmimics 或 Let-7a 模拟物共转染,其中 500 ng 报告分子中包含 3'UTR-Wt 或 3'UTR-Mut。转染 48 h 后,将细胞在 Passive Lysis Buffer (Promega, WI, USA) 中裂解,添加 Dual-Luciferase<sup>®</sup>,并根据说明书通过 GloMax<sup>®</sup>20/20 发光计(Promega)测量荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶。

### 1.10 qPCR、WB、MTT、Transwell 等实验检测 Let-7a 通过 EXO 影响 MDA-MB-231 细胞的生物学功能

用 EXO FBS 完全培养基对细胞进行培养,待 MDA-MB-231 细胞汇合度达 90% 后,用 PBS 洗涤细胞。通过差速离心从培养基中分离 EXO。简而言之,将培养基以  $300 \times g$  室温离心 10 min,然后在 4  $^{\circ}$ C 下以  $2\ 000 \times g$  离心 20 min 以除去细胞,然后通过 0.22  $\mu$ m 的过滤膜除去细胞碎片。通过超速离心法以  $40\ 000 \times g$  离心 90 min。将获得的 EXO 重悬于 PBS 中,再次以  $40\ 000 \times g$  离心 90 min 进行收集。EXO 的大小和浓度采用 qNano 进行测定。透射电子显微镜下观察野生型及过表达 Let-7a 的 MDA-MB-231 细胞的形态,WB 实验检测 2 种细胞分离的 EXO 表面标志物。qPCR、WB、MTT、Transwell 等实验检测 Let-7a 通过 EXO 影响

MDA-MB-231 细胞的生物学功能,实验方法同 1.3、1.4、1.6 和 1.7。实验重复 3 次。

### 1.11 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Let-7a 与 MYC 在 TNBC 组织和细胞系中的表达呈负相关

GEO 数据库生物信息学(GSE27447)组织芯片检测结果(图 1A)显示,Let-7a 在 TNBC 组织中的表达水平低于癌旁组织( $P < 0.05$ );生长曲线分析 Let-7a 的表达水平与 TNBC 患者预后的关系,结果(图 1B)显示,Let-7a 低表达 TNBC 患者的总存活时间明显低于高表达 Let-7a 的患者( $P < 0.05$ )。qPCR 检测结果(图 1C、D)显示,MYC 在肿瘤组织中的表达水平显著高于癌旁组织,而 Let-7a 在肿瘤组织中表达水平显著低于癌旁组织(均  $P < 0.01$ )。qPCR 及 WB 实验检测结果(图 1E、F)显示,Let-7a 在乳腺癌系 MCF-7、T47D、sk-br-3、MDA-MB-231 细胞中显著低表达,而 MYC 在乳腺癌细胞系中显著高表达(均  $P < 0.01$ )。

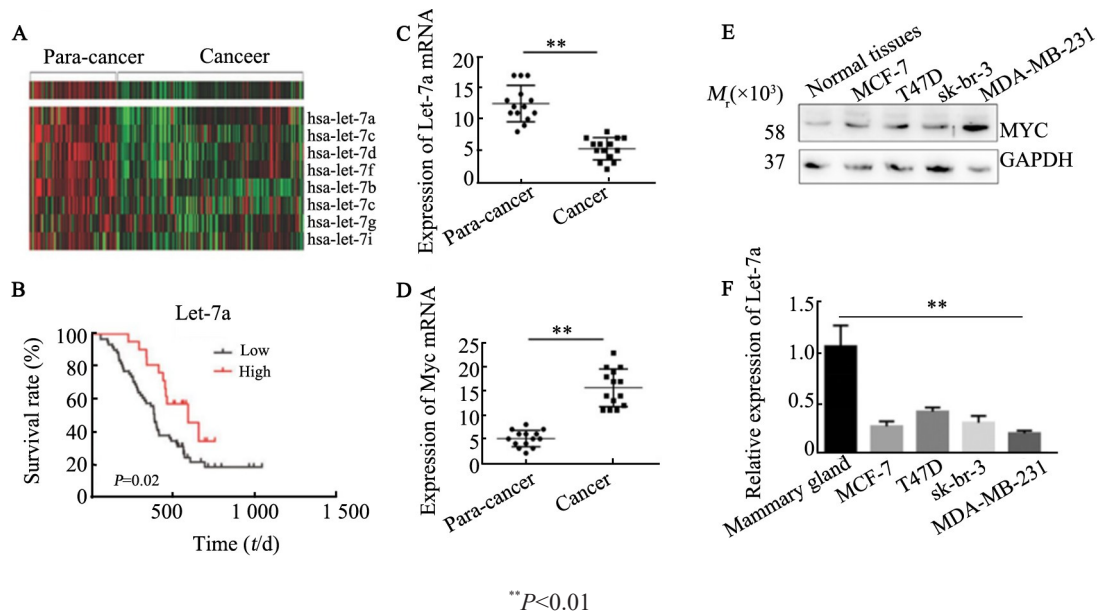
### 2.2 MYC 促进 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭

通过 Crisper/cas-9 构建 MYC 敲除的 MDA-MB-231 细胞,qPCR 与 WB 实验结果(图 2A、B)显示,敲除细胞中的 MYC 几乎不表达,表示敲除细胞(简称 KO 细胞)构建成功。MTT 实验检测结果(图 2C)显示,与 MDA-MB-231 细胞相比,MYC 敲除显著抑制了 MDA-MB-231 KO 细胞的增殖能力( $P < 0.01$ )。Transwell 侵袭实验结果(图 2D)显示,MDA-MB-231 细胞侵袭率高于 MDA-MB-231 KO 细胞[( $89.33 \pm 4.91$ )% vs ( $50.00 \pm 3.06$ )%,  $P < 0.01$ ]。划痕愈合实验检测结果(图 2E)显示,在 24、48 h,MDA-MB-231 细胞较 MDA-MB-231 KO 细胞划痕愈合率明显提高( $P < 0.01$ )。上述结果表明,MYC 可以促进乳腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭。

### 2.3 过表达 Let-7a 抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖能力

构建过表达 Let-7a 的 MDA-MB-231 细胞,慢病毒转染 Let-7a 后,qPCR 实验检测结果(图 3A)显示,转染细胞较野生型的 MDA-MB-231 细胞 Let-7a 表达量明显增加( $P < 0.01$ )。MTT 实验检测结果(图 3B)显示,与野生型细胞相比,过表达 Let-7a 可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖能力( $P < 0.01$ )。划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验检测结果(图 3C、D)显

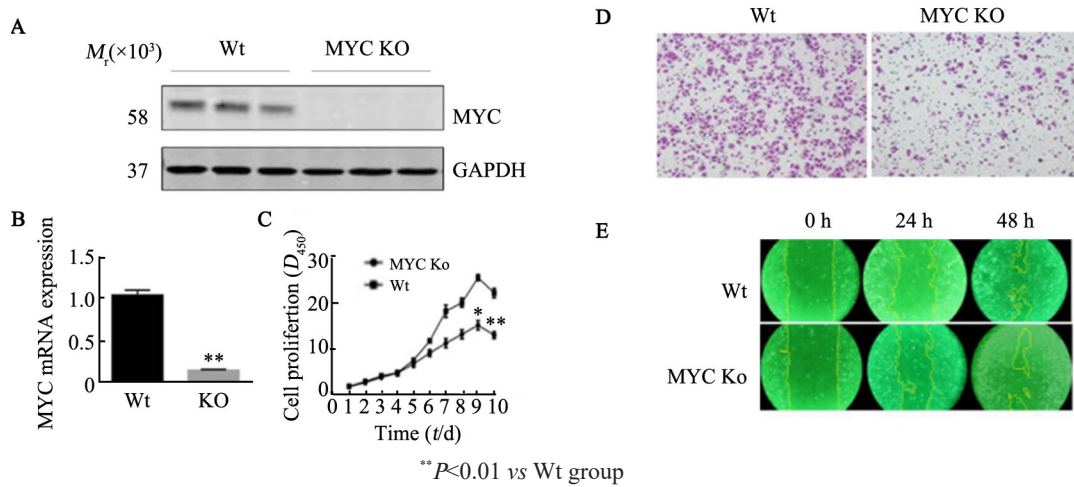
示, 过表达 Let-7a 可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞 抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭。  
的迁移与侵袭 ( $P < 0.01$ )。上述结果表明, Let-7a 可以



A: Microarray detection of Let-7a in TNBC tissue; B: The correlation between Let-7a and survival rate of TNBC patients;  
C: Let-7a expression in TNBC tissues detected by qPCR; D: MYC in TNBC tissue detected by qPCR;  
E: MYC protein expression in TNBC cell lines;  
F: Let-7a protein expression in TNBC cell lines

图1 MYC与Let-7a在TNBC组织和细胞系中的表达

Fig.1 Expressions of MYC and Let-7a in TNBC tissues and cell lines



A: WB assay was used to verify the expression of MYC in knockout cells; B: qPCR was used to verify the content of MYC gene in knockout cells; C: Effect of MYC on proliferation of MDA-MB-231 cells detected by MTT; D: Effect of MYC on the invasion of MDA-MB-231 cells detected by Transwell assay ( $\times 10$ ); E: Effect of MYC on migration of MDA-MB-231 cells detected by scratch healing test

图2 MYC对MDA-MB-231细胞恶性生物学行为的影响

Fig. 2 Effects of MYC on malignant biological behaviors of MDA-MB-231 cells

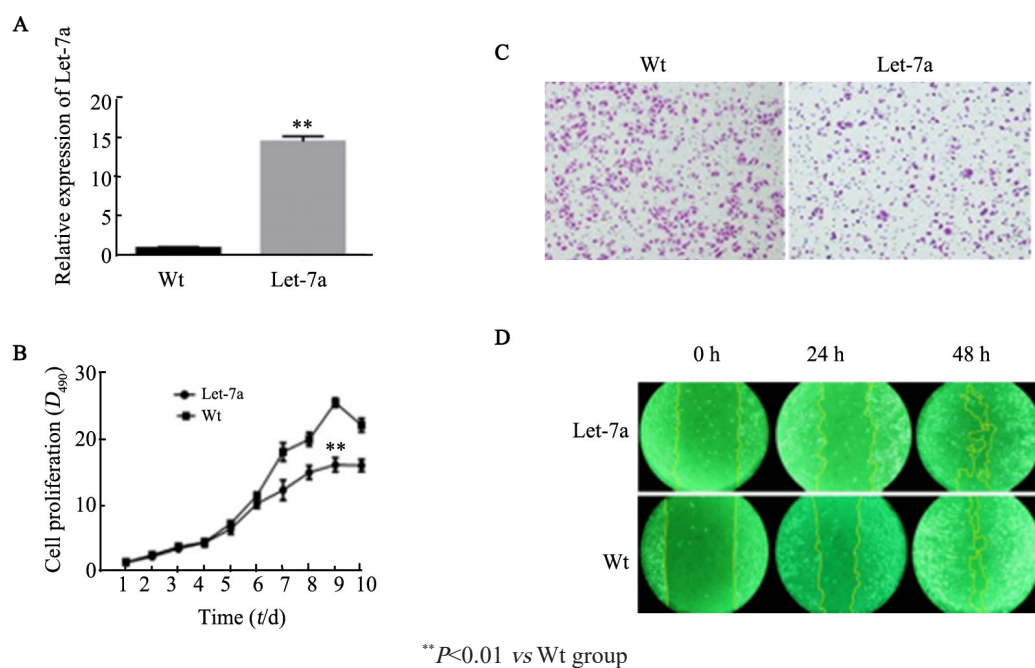
#### 2.4 确定MYC是Let-7a的作用靶点

为了验证MYC是Let-7a的直接靶基因, 本实验将MYC的mRNA的3'非翻译区(3'UTR-Wt)克隆至pmirGLO载体中, 然后通过定点突变预测的Let-7a结

合位点(3'UTR-Mut)(图4A), 随后将混合质粒转染进细胞。荧光素酶活性实验检测结果(图4B)显示, Let-7a过表达明显抑制3'UTR-Wt介导的荧光素酶活性 ( $P < 0.05$ ), 而突变了Let-7a结合位点则消除了这种抑

制作用。WB实验检测结果(图4C)显示,在过表达Let-7a的细胞中,MYC的表达水平较野生型的细胞明显减少( $P<0.05$ ),而应用针对Let-7a的抗体处理细胞后,发现过表达Let-7a的细胞中MYC的表达水平

又重新升高(图4D)。上述结果表明,Let-7a通过作用于MYC基因的3'UTR使其沉默,从而减少MYC蛋白的表达。

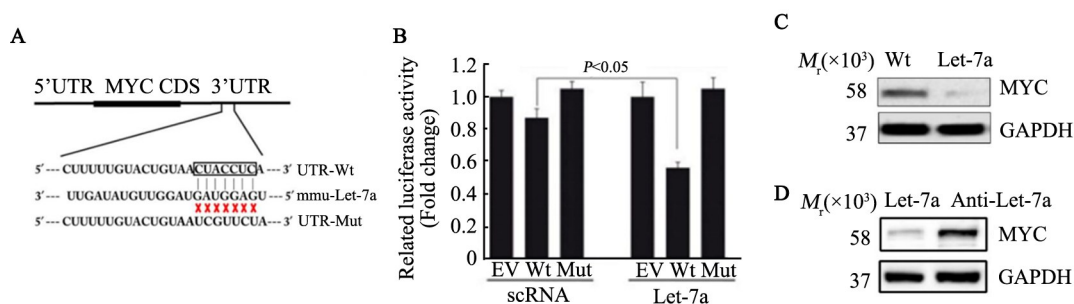


\*\* $P<0.01$  vs Wt group

A: WB assay was used to verify the expression of Let-7a in MDA-MB-231 cells; B: Effect of Let-7a on the proliferation of MDA-MB-231 cells by MTT assay; C: Effect of Let-7a on proliferation of MDA-MB-231 cells detected by Transwell( $\times 100$ ); D: Effect of Let-7a on the invasion of MDA-MB-231 cells detected by Transwell invasion assay

图3 Let-7a对MDA-MB-231细胞恶性生物学行为的影响

Fig. 3 Effects of Let-7a on malignant biological behaviors of MDA-MB-231 cells



A: Schematic map of mutation sequence in 3'UTR region of MYC gene; B: Luciferase reporter gene validated the binding site;

C: WB assay was used to detect MYC expression in MDA-MB-231 cells over-expressing Let-7a;

D: The expression level of MYC in MDA-MB-231 cells after treatment with Let-7a antibody

图4 Let-7a与MYC的靶向作用关系

Fig.4 Targeting relationship between Let-7a and MYC

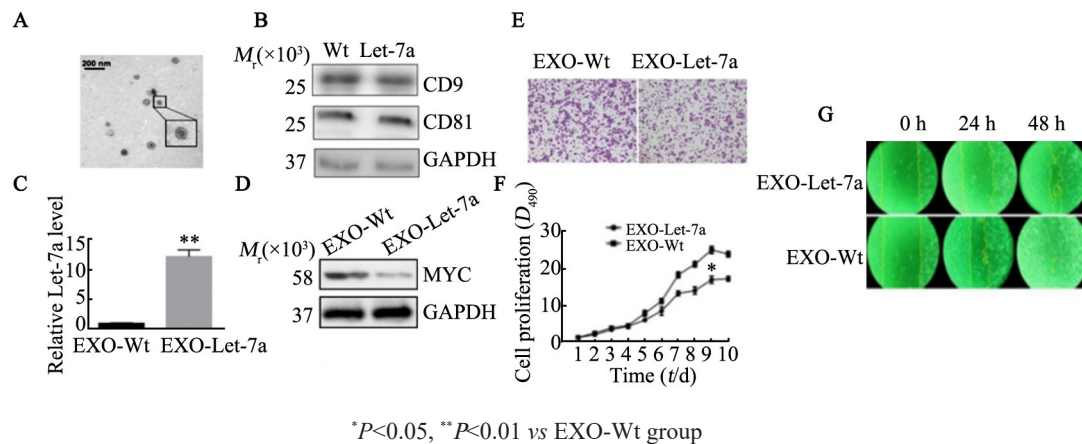
### 2.5 Let-7a通过EXO影响MDA-MB-231细胞的生物学功能

提取野生型及过表达Let-7a的MDA-MB-231细胞的EXO,透射电子显微镜下观察两种细胞分离的EXO形态均表现为典型外泌体结构,即直径为40~100 nm,有完整双层脂膜包被的杯口状的囊泡样结构(图5A);WB实验检测结果(图5B)显示,两种细胞

分离的EXO均表达表面标志物CD9和CD81,其形态学和分子水平证实了所分离囊泡确认均为EXO。qPCR实验检测结果(图5C)显示,过表达Let-7a细胞的外泌体中,Let-7a含量远高于野生型( $P<0.01$ ),表明Let-7a会被EXO包裹。将所提的2种EXO分别与野生型的MDA-MB-231细胞共孵育后,WB检测结果(图5D)显示,EXO-Let-7a可以显著抑制MDA-MB-

231 细胞 MYC 的表达水平 ( $P < 0.05$ ); MTT 实验检测结果 (图 5E) 显示, EXO-Let-7a 可以明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ); Transwell 侵袭实验结果显示, Exo-Let-7a 的细胞中的 EXO 可以明显抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力 (图 5F); 划痕愈合实

验结果 (图 5G) 显示, 过表达 Let-7a 细胞中的 EXO 显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力 ( $P < 0.05$ )。上述结果显示, Let-7a 通过 EXO 运输至肿瘤细胞, 进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭能力。



A: Electron micrographs show the isolated exosomes ( $\times 10\ 000$ ); B: WB was used to verify the expression level of CD9 and CD81 in exosome; C: Detection of Let-7a in exosomes by qPCR; D: Detection of MYC in wild type MDA-MB-231 cells co-incubated with exosomes by WB; E: Transwell assay was used to detect the effect of exosomes on the invasion of MDA-MB-231 cells; F: MTT assay was used to detect the effect of exosomes on the proliferation of MDA-MB-231 cells; G: The effect of exosome on the migration of MDA-MB-231 cells by scratch healing test ( $\times 10$ )

图 5 EXO 介导的 Let-7a 对 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为的影响

Fig. 5 Effect of exosome-mediated Let-7a on malignant biological behaviors of MDA-MB-231 cells

### 3 讨论

MYC 是多种细胞信号通路的重要靶分子, 其异常表达造成癌基因的激活, 促进肿瘤的发生、发展。有研究<sup>[6-7]</sup>表明, 与其他分型乳腺癌相比, TNBC 组织中 MYC 异常高表达。研究<sup>[8]</sup>表明, MYC 在功能上常位于信号通路末端的几个级联, 起到激活多个信号通路的作用, 有可能对肿瘤的发生发展起到关键作用。本研究验证了 MYC 在 TNBC 组织中显著高表达。另外, 本研究还通过构建 MYC 敲除的 MDA-MB-231 细胞系, 验证了 MYC 可以明显提高 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭能力。

miRNA 通过与靶 mRNA 3'-UTR 区完全或部分互补结合, 导致靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制, 从而调控靶基因的表达<sup>[9]</sup>。每个 miRNA 可以调控多个靶基因, 对生长发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化等生理活动中起到重要的调控作用。miRNA 在乳腺癌治疗的应用中主要以 miRNA 本身为靶点开展靶向治疗或根据乳腺癌的分子分型个体化应用治疗药物。其中 Let-7a 是目前研究最广泛的 miRNA 之一, 其通过调控原癌基因和细胞周期相关基因的表达来调控细胞周期及细胞分化<sup>[10]</sup>。LIU 等<sup>[11]</sup>研究发现, 与正常

乳腺组织相比, Let-7a 在乳腺癌组织中低表达。也有研究<sup>[12]</sup>通过基因芯片技术证明了 Let-7a 在乳腺癌组织中明显低表达。目前关于 Let-7a 与 TNBC 的相关研究尚十分不足。本研究首先通过生物信息学分析发现, Let-7a 低表达与 TNBC 患者的不良预后明显相关。本研究验证了 Let-7a 在 TNBC 组织和细胞中低表达, 并通过构建过表达 Let-7a 的 MDA-MB-231 细胞系, 验证了 Let-7a 低表达可以显著增加 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭能力。

MYC 作为一个重要的肿瘤相关基因, 受到具有抑癌基因作用的 miRNA 的转录后调控<sup>[13]</sup>。而另有研究<sup>[14]</sup>报道, 成熟的 Let-7a 通过完全或不完整的形式结合靶 mRNA 的 3' UTR 区, 降解目标 mRNA 或抑制其翻译过程。本研究通过荧光报告系统分析了 Let-7a 与 MYC 基因的调控作用, 证明了 Let-7a 通过作用于 MYC 基因的 3' UTR 区发挥作用。

EXO 可以有效保护 miRNA, 使其长期稳定存在, 并将 miRNA 运输进入到受体细胞内, 通过抑制某些基因的表达实现对受体细胞的调控作用。miRNA 大多存在于 EXO 中, 主要以前体形式存在, 尽管循环中仍有游离的 miRNA, 但研究者<sup>[5]</sup>们认为存在于 EXO 中的 miRNA 比循环中游离的 EXO 更具有生物学功能。

研究<sup>[15]</sup>表明,肿瘤细胞分泌的EXO中非编码RNA主要是失活的抗癌基因和活化的抑癌基因,进入受体细胞后调节受体细胞的肿瘤发生。OHNO等<sup>[16]</sup>采用基因工程技术在外泌体包膜上插入表皮生长因子受体结合片段GE11,利用改造后的EXO将Let-7a特异性传输至表达EGFR的乳腺癌细胞中,Let-7a通过抑制HMGA2或者RAS家族成员的表达,而抑制肿瘤细胞的增殖。因此本研究提取了野生型及过表达Let-7a的MDA-MB-231细胞的EXO,探究了Let-7a与MYC对TNBC的调控关系,证明Let-7a是通过EXO介导而发挥抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移与侵袭能力。

本研究证实了EXO介导的Let-7a通过作用于MYC基因3'UTR区使得MYC基因沉默,从而抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移与侵袭,但在MDA-MB-231细胞中Let-7a基因低表达的原因尚未能进行探索。研究<sup>[17]</sup>表明,MYC能够通过转录激活或转录抑制实现对miRNA的表达调控,进而通过miRNA的靶基因促进肿瘤的发生发展。受MYC转录调控抑制的miRNA均是直接靶向MYC基因相关的miRNA,并且在肿瘤细胞内表达多处于抑制状态<sup>[18]</sup>。因此下一步本课题组将继续研究在TNBC组织中Let-7a低表达是否是MYC抑制的。

综上所述,本研究一定程度上揭示了MYC、Let-7a及EXO在TNBC组织和细胞发生发展过程中的作用,为TNBC的治疗提供了启示。

#### [参考文献]

- [1] SABLE M, PAI T D, SHET T, et al. Triple-negative breast cancer: a comprehensive study of clinical, histomorphological, and immunohistochemical features in Indian patients[J]. *Int J Surg Pathol*, 2017, 25(3): 230-237. DOI:10.1177/1066896916667815.
- [2] BRAICU C, CHIOREAN R, IRIMIE A, et al. Novel insight into triple-negative breast cancers, the emerging role of angiogenesis, and antiangiogenic therapy[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2016, 18: e18. DOI:10.1017/erm.2016.17.
- [3] NAKASHOJI A, MATSUI A, NAGAYAMA A, et al. Clinical predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer[J/OL]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4135-4141[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111111>. DOI:10.3892/ol.2017.6692.
- [4] GAO D, JIANG L L. Exosomes in cancer therapy: a novel experimental strategy[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(11): 2165-2175 [2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30111111>. DOI:10.3892/ajcr.2018.16654.
- [5] YANG B W, CHEN Y, SHI J L. Exosome biochemistry and advanced nanotechnology for next-generation theranostic platforms[J]. *Adv Mater Weinheim*, 2019, 31(2): e1802896. DOI:10.1002/adma.201802896.
- [6] ANDERS C K, ABRAMSON V, TAN T, et al. The evolution of triple-negative breast cancer: from biology to novel therapeutics[J]. *Am Soc*

- Clin Oncol Educ Book*, 2016, 35: 34-42. DOI:10.1200/EDBK\_159135.
- [7] KARAGOZ K, SINHA R, ARGAS K Y. Triple negative breast cancer: a multi-omics network discovery strategy for candidate targets and driving pathways[J]. *OMICS*, 2015, 19(2): 115-130. DOI:10.1089/omi.2014.0135.
- [8] HARTL M. The quest for targets executing MYC-dependent cell transformation[J/OL]. *Front Oncol*, 2016, 6: 132[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27111111>. DOI:10.3389/fonc.2016.00132.
- [9] PINWEHA P, RATTANAPORN SOMPONG K, CHAROENSAWAN V, et al. MicroRNAs and oncogenic transcriptional regulatory networks controlling metabolic reprogramming in cancers[J/OL]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 223-233[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28111111>. DOI:10.1016/j.csbj.2016.05.005.
- [10] JOHNSON C D, ESQUELA-KERSCHER A, STEFANI G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7713-7722. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-1083.
- [11] LIU K, ZHANG C F, LI T, et al. Let-7a inhibits growth and migration of breast cancer cells by targeting HMGA1[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(6): 2526-2534. DOI:10.3892/ijo.2015.2949.
- [12] SALEH A D, SAVAGE J E, CAO L, et al. Cellular stress induced alterations in microRNA let-7a and let-7b expression are dependent on p53[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e24429[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111111>. DOI:10.1371/journal.pone.0024429.
- [13] MATKAR S, SHARMA P, GAO S B, et al. An epigenetic pathway regulates sensitivity of breast cancer cells to HER2 inhibition via FOXO/c-myc axis[J/OL]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 472-485[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111111>. DOI:10.1016/j.ccell.2015.09.005.
- [14] MACKEDENSKI S, WANG C Y, LI W M, et al. Characterizing the interaction between insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IMP1) and KRAS expression[J]. *Biochem J*, 2018, 475(17): 2749-2767. DOI:10.1042/BCJ20180575.
- [15] GORDON R D. Regulation of sodium balance in the distal nephron: urinary exosomes contribute to knowledge[J]. *J Hypertens*, 2017, 35(2): 246-247. DOI:10.1097/HJH.0000000000001196.
- [16] OHNO S, TAKANASHI M, SUDO K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells[J/OL]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 185-191[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111111>. DOI:10.1038/mt.2012.180.
- [17] EILERS M, EISENMAN R N. Myc's broad reach[J/OL]. *Genes Dev*, 2008, 22(20): 2755-2766[2019-05-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111111>. DOI:10.1101/gad.1712408.
- [18] ZHANG X W, ZHAO X H, FISKUS W, et al. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas[J/OL]. *Cancer Cell*, 2012, 22, 506-523[2019-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079660>. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.09.003.

[收稿日期] 2019-06-15

[修回日期] 2019-08-02

[本文编辑] 王映红