

耐药乳腺癌MCF-7/Adr细胞c-myc的表达上调及与耐药的关系

c-myc是一个功能甚多的早期反应基因,参与细胞增殖、分化和凋亡等生理过程。近年来研究发现c-myc具有调节多种化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡的效应[1][2],提示c-myc的异常可能参与肿瘤多药耐药。本研究观察多药耐药乳腺癌MCF-7/Adr细胞c-myc的表达状态及c-myc反义寡核苷酸对MCF-7/Adr细胞阿霉素耐药的调节效应,初步探讨c-myc表达异常与肿瘤细胞耐药的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞系和培养条件

耐药乳腺癌细胞MCF-7/Adr系阿霉素(Doxorubicin, DOX)低剂量逐级诱导MCF-7产生的耐药亚系,对阿霉素、环磷酰胺、足叶乙甙等多种药物交叉耐药,抗药程度分别为几十至上百倍,其耐药机制主要为多药耐药基因MDR1介导[3]。MCF-7/Adr 和其亲本药敏系MCF-7均引自中国医学科学院药物研究所。两种细胞均于DMEM完全培养基(10%小牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺,100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素)中贴壁生长,37 ℃、5%CO₂、100%湿度下培养至对数生长期进行实验。MCF-7/Adr在传代培养时培养基中加入5 μmol/L的DOX(Farmitalia,意大利)以维持抗药性。实验前一周将DOX撤除。

1.2 流式细胞术检测c-myc表达

0.25%胰酶-EDTA消化MCF-7/Adr和MCF-7,调整细胞浓度至 5×10^6 /ml。以1%甲醛4 ℃固定5 min,加入99%甲醇30 min,PBS洗两遍。用细胞打孔液(0.01 mol/L PBS,0.1% Triton-X-100,1%枸橼酸钠)4 ℃作用45 min,PBS清洗;2% BSA封闭20 min,加入1:50稀释的抗人c-myc单抗(Santa cruz),37 ℃作用1 h,PBS清洗3遍;加入1:10羊抗鼠FITC-IgG(Santa cruz)(二抗),37 ℃作用30 min,PBS再清洗3遍。流式细胞仪FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA)检测。

1.3 c-myc 硫代反义寡核苷酸的设计和合成

参照文献[4],c-myc 硫代反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)序列为:p-AAC GTT GAG GGG CAT,该序列针对c-myc基因核苷酸序列2 298~2 312,即与第2外显子开头5个三联码序列互补,经检索与c-myc以外的人类基因无同源性。同时设计无反义作用的4个碱基错配的反义错配寡核苷酸序列(mismatch oligonucleotide, MMODN)作为对照,序列为:p-AAC GAG TTG GGG CAT,划线部分为错配碱基。上述硫代反义寡核苷酸序列由中国科学院上海生化所合成。

1.4 半数抑制浓度(IC₅₀)的测定

0.25%胰酶-EDTA 消化MCF-7/Adr和MCF-7,调整细胞浓度至 1×10^5 /ml,100 μl/孔接种于96孔板,37 ℃、5% CO₂培养过夜。每孔加入不同浓度梯度(0.05、0.5、5、50 μmol/L)的DOX,而后分别加入4 μmol/L c-myc ASODN 或c-myc MMODN,每组设3个复孔。对照组只加入相应体积的DMEM培养液。72 h后,每孔吸出100 μl培养液上清,加入10 μl MTT(5 mg/mL MTT溶于PBS液中)孵育4 h。平板离心机离心,小心吸去上清,每孔加入100 μl 二甲亚砜。待甲瓚溶解,置ELISA检测仪570 nm处读取D(λ)值,按下式计算生长抑制率:抑制率=[1-实验组D(λ)值/对照组D(λ)值]×100%。以抑制率为纵坐标Y、药物浓度对数(lgX)为横坐标作图。

1.5 统计学处理

应用SPSS 8.0统计软件,采用两样本均数t检验。曲线拟合($Y=b_0lgX+b_1$)求出DOX单独或与反义寡核苷酸共孵育情况下的 IC_{50} 。

2 结果

2.1 MCF-7/Adr耐药细胞c-myc的表达上调

MCF-7/Adr c-myc表达率为70.48%, MCF-7 c-myc表达率仅为46.02%(图1),表明MCF-7/Adr c-myc表达明显高于MCF-7($P<0.05$),处于上调表达状态。

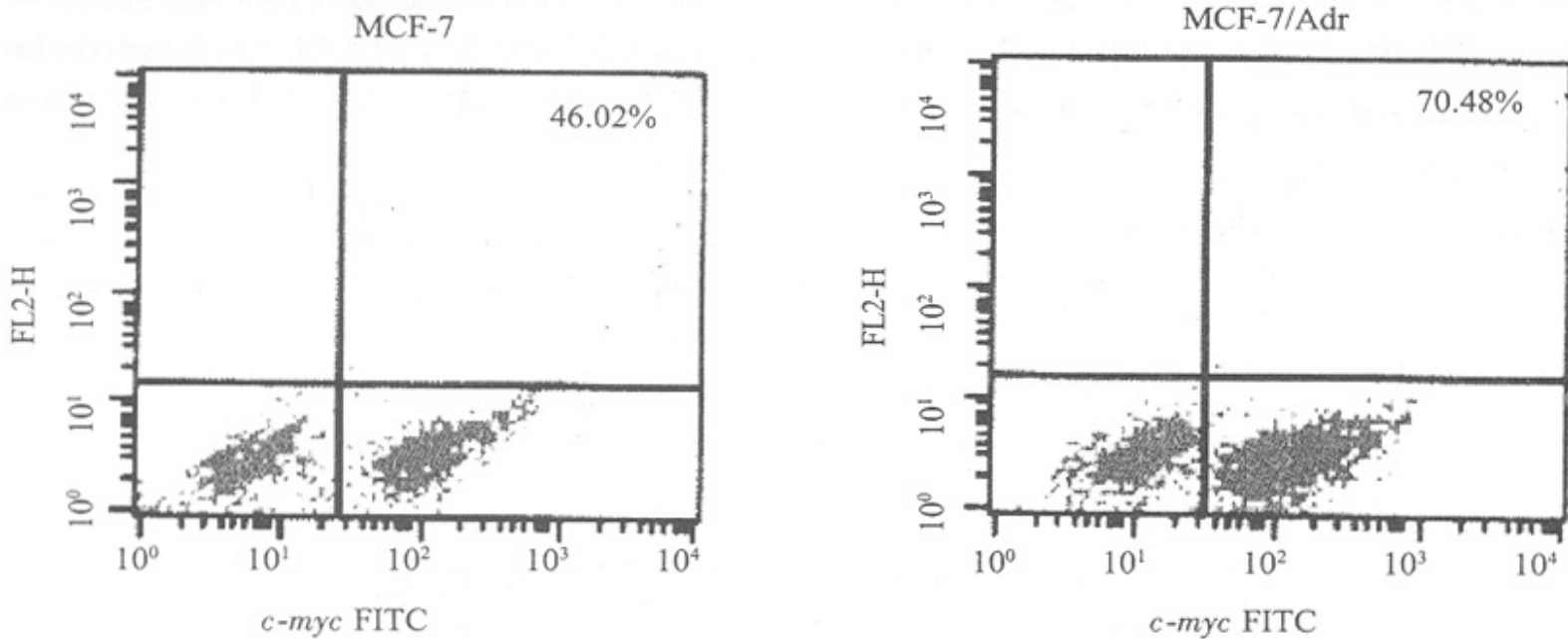


图1 流式细胞仪检测c-myc在MCF-7/Adr和MCF-7细胞上表达
Fig.1 c-myc expression in MCF-7/Adr and MCF-7 cells detected by flow cytometry

2.2 c-myc反义寡核苷酸对MCF-7/Adr耐药性的逆转

在预实验中观察到, c-myc ASODN在4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下基本不影响MCF-7/Adr的增殖速率,因此本实验c-myc ASODN的作用浓度选定为4 $\mu\text{mol/L}$ 。DOX单独作用于MCF-7/Adr, IC_{50} 值为(22.00 \pm 1.92) $\mu\text{mol/L}$;在c-myc MMODN共孵育情况下, IC_{50} 值为(20.60 \pm 3.20) $\mu\text{mol/L}$;但与c-myc ASODN共孵育时, IC_{50} 值降至(9.60 \pm 1.04) $\mu\text{mol/L}$,较DOX单独作用降低52.4%,与前两者比较差异显著($P<0.05$)。表明c-myc反义寡核苷酸可显著增强DOX对MCF-7/Adr的杀伤效应,即部分逆转MCF-7/Adr对DOX的耐药性。同时本实验还观察到DOX单独作用于MCF-7时, IC_{50} 值为(0.15 \pm 0.04) $\mu\text{mol/L}$,与c-myc ASODN共孵育时, IC_{50} 值为(0.13 \pm 0.02) $\mu\text{mol/L}$,两者无明显差异,表明c-myc ASODN无增强DOX对MCF-7的杀伤效应。

3 讨论

c-myc过度表达或失控与多种肿瘤的发生和转移密切相关,它可改变细胞内的基因调控,使细胞易于转化为恶性表型[5]。近来研究显示, idarubicin、camptothecin等拓扑异构酶I、II抑制剂可诱导MCF-7细胞DNA损伤并抑制c-myc表达[2]。Nebisit等[6]报道c-myc的表达增强了鼠D32肿瘤细胞对顺铂、阿霉素、足叶乙甙等多种药物的敏感性。这些研究提示c-myc可调节化疗药物杀伤肿瘤细胞的效应, c-myc表达异常可能参与肿瘤细胞耐药性调控。

Mituzani等[7]报道c-myc反义核酸可增强顺铂对膀胱肿瘤细胞的杀伤效应；国内张浩等[8]报道将反义c-myc基因转染胶质瘤细胞BT325，顺铂诱导凋亡的过程明显受阻；还有学者观察到经过单一剂量顺铂治疗，DA大鼠体内的残存肿瘤细胞c-myc表达上升了两倍[9]。这些报道提示c-myc的过表达与肿瘤细胞对顺铂的抗药性明显相关。本研究发现MCF-7/Adr c-myc表达水平明显高于其亲本系MCF-7，表明耐药的MCF-7/Adr c-myc表达上调。那么c-myc上调表达是否参与MCF-7/Adr的耐药调节呢？我们观察到c-myc ASODN显著增强了DOX对MCF-7/Adr的杀伤效应并显著降低其IC₅₀值，而对药敏的MCF-7则无此效应，这一结果提示抑制c-myc表达可部分逆转MCF-7/Adr对DOX的抗药性。由此可推断，c-myc上调表达参与MCF-7/Adr耐药细胞对DOX的抗药性。c-myc上调表达与多药耐药的相关性为深入研究多药耐药的调控网络拓宽了新的思路。Naishiro等[10]认为c-myc联合mdr1基因可以抑制肠上皮细胞的死亡过程。c-myc上调表达增强MCF-7/Adr耐药性的机制还有待进一步研究。我们推测可能与c-myc转录激活因子功能有关，c-myc表达上调可促进mdr1等抗药基因的转录活化及表达。

参考文献：

- [1] Dong J, Naito M, Tsuruo T. c-myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells [J]. *Oncogene*, 1997, 15(6): 639-47.
- [2] Pramod T, Frank A, Fornari JK, et al. Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the topoisomerase inhibitor, Camptothecin, in MCF-7 human breast tumor cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(6): 1263-9.
- [3] 袁亚维, 张积仁, 周殿元. Ribozyme基因对人肿瘤细胞株MCF-7/Adr多药抗药性的靶向逆转[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(7): 494-6.
- Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY. The reversion of multidrug resistance in tumor cell line MCF-7/Adr by ribozyme[J]. *Natl Med J Chin*, 1997, 77(7): 494-6.
- [4] Skorski T, Perrotti D, Nieborowska M, et al. Antileukemia effect of c-myc N3'-P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3966-71.
- [5] Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease[J]. *Oncogene*, 1999, 18(19): 3004-16.
- [6] Nesbit SE, Grove LE, Yin X, et al. Distinct apoptotic response imparted by c-myc and max[J]. *Blood*, 1998, 92(3): 1003-10.
- [7] Mituzani Y, Fukumoto M, Bonavida B, et al. Enhancement of sensitivity of urinary bladder tumor cells to cisplatin antisense oligonucleotide[J]. *Cancer*, 1994, 74(4): 2546-53.
- [8] 张浩, 王成济, 杨安钢, 等. c-myc表达对顺铂诱导人胶质瘤细胞系BT325凋亡的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9(3): 322-5.
- Zhang H, Wang CJ, Yang AG, et al. The effect of c-myc expression on cisplatin-induced apoptosis of BT325, human glioma cells[J]. *Chin J Histo Chem Cyto Chem*, 2000, 9(3): 322-5.
- [9] Walker TL, White JD, Esdale WJ, et al. Tumor cells surviving in vivo cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(5): 610-4.
- [10] Naishiro Y, Takaoka AS, Naishiro Y, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4761-6.

参考文献：

- [1] Dong J, Naito M, Tsuruo T. c-myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells [J]. *Oncogene*, 1997, 15(6): 639-47.
- [2] Pramod T, Frank A, Fornari JK, et al. Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the topoisomerase inhibitor, Camptothecin,

in MCF-7 human breast tumor cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(6): 1263-9.

[3] 袁亚维, 张积仁, 周殿元. Ribozyme基因对人肿瘤细胞株MCF-7/Adr多药抗药性的靶向逆转[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(7): 494-6.

Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY. The reversion of multidrug resistance in tumor cell line MCF-7/Adr by ribozyme[J]. *Natl Med J Chin*, 1997, 77(7): 494-6.

[4] Skorski T, Perrotti D, Nieborowska M, et al. Antileukemia effect of c-myc N3'-P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3966-71.

[5] Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease[J]. *Oncogene*, 1999, 18(19): 3004-16.

[6] Nesbit SE, Grove LE, Yin X, et al. Distinct apoptotic response imparted by c-myc and max[J]. *Blood*, 1998, 92(3): 1003-10.

[7] Mituzani Y, Fukumoto M, Bonavida B, et al. Enhancement of sensitivity of urinary bladder tumor cells to cisplatin antisense oligonucleotide[J]. *Cancer*, 1994, 74(4): 2546-53.

[8] 张浩, 王成济, 杨安钢, 等. c-myc表达对顺铂诱导人胶质瘤细胞系BT325凋亡的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9(3): 322-5.

Zhang H, Wang CJ, Yang AG, et al. The effect of c-myc expression on cisplatin-induced apoptosis of BT325, human glioma cells[J]. *Chin J Histo Chem Cyto Chem*, 2000, 9(3): 322-5.

[9] Walker TL, White JD, Esdale WJ, et al. Tumor cells surviving in vivo cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(5): 610-4.

[10] Naishiro Y, Takaoka AS, Naishiro Y, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4761-6.