

## 耐药乳腺癌 MCF-7/Adr 细胞 *c-myc* 的表达上调及与耐药的的关系

陈俊<sup>1</sup>,袁亚维<sup>1</sup>,张积仁<sup>2</sup>,周殿元<sup>3</sup>(第一军医大学珠江医院<sup>1</sup>放疗科;<sup>2</sup>肿瘤科,广东广州 510282;<sup>3</sup>南方医院消化科,广东广州 510515)

**摘要:**目的 观察耐药乳腺癌细胞 *c-myc* 表达及其反义寡核苷酸对耐药的逆转效应,探讨 *c-myc* 在耐药调控中的作用。方法 运用流式细胞仪检测乳腺癌耐药细胞 MCF-7/Adr 和其药敏亲本系 MCF-7 的 *c-myc* 表达水平。MTT 法测定阿霉素作用于上述细胞的药物半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。结果 MCF-7/Adr 耐药细胞 *c-myc* 的表达率为 70.48%,其亲本药敏细胞系 MCF-7 *c-myc* 表达率仅 46.02%,前者显著高于后者 ( $P < 0.05$ )。阿霉素单独作用于 MCF-7/Adr, IC<sub>50</sub> 值为 (22.00 ± 1.92) μmol/L,但与 4 μmol/L *c-myc* 反义寡核苷酸共孵育后,阿霉素的 IC<sub>50</sub> 值则显著下降为 (9.60 ± 1.04) μmol/L。结论 与其亲本药敏细胞相比较, MCF-7/Adr 的 *c-myc* 表达显著上调,抑制 *c-myc* 的过表达可部分逆转 MCF-7/Adr 的阿霉素抵抗,提示 *c-myc* 参与肿瘤耐药的发生。

**关键词:** 乳腺肿瘤;基因 *myc*;寡核苷酸类;反义;抗药性;多药;阿霉素

中图分类号:R329.25;R733 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)02-0124-03

## Up-regulation of *c-myc* expression in MCF-7/Adr human breast cancer cells and its association with resistance against doxorubicin

CHEN Jun<sup>1</sup>, YUAN Ya-wei<sup>1</sup>, ZHANG Ji-ren<sup>2</sup>, ZHOU Dian-yuan<sup>3</sup>

Departments of Radiotherapy<sup>1</sup> and Oncology<sup>2</sup>, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; <sup>3</sup>Department of Digestive Disease, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of *c-myc* in drug-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells and the counteractive effect of *c-myc* antisense oligonucleotide on their drug-resistance. **Methods** Flow cytometry was performed to examine *c-myc* expression in multi-drug resistant MCF-7/Adr cell line and its parental cell line MCF-7. The IC<sub>50</sub> value of doxorubicin was evaluated by MTT assay. **Results** MCF-7/Adr cell line was shown to have a significantly higher expression rate of *c-myc* than its parent cell line MCF-7 (70.48% vs 46.02%). The IC<sub>50</sub> value of doxorubicin was (22.00 ± 1.92) μmol/L in MCF-7/Adr cells, which was significantly decreased to (9.60 ± 1.04) μmol/L ( $P < 0.05$ ) after coincubation with 4 μmol/L *c-myc* antisense oligonucleotide. **Conclusion** *c-myc* expression is up-regulated in MCF-7/Adr cells as compared with their parent cell line MCF-7. Inhibition of *c-myc* expression may partially reverse the resistance of MCF-7/Adr against doxorubicin, suggesting that *c-myc* may be involved in the mechanism of drug-resistance of tumor cells.

**Key words:** breast neoplasms; gene, *myc*; oligonucleotides, antisense; drug resistance, multiple; doxorubicin

*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<sup>[1,2]</sup>,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

收稿日期 2001-10-14

基金项目:国家自然科学基金(30100045)

作者简介:陈俊(1971-),男,福建闽清人,1999年毕业于第一军医大学,博士,主治医师,电话 020-85143841, E-mail:junchen71@163.net

### 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<sup>[3]</sup>。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 °C、5%CO<sub>2</sub>、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  $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。以 1%甲醛  $4^\circ\text{C}$  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)  $4^\circ\text{C}$  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),  $37^\circ\text{C}$  作用 1 h, PBS 清洗 3 遍; 加入 1:10 羊抗鼠 FITC-IgG (Santa cruz) (二抗),  $37^\circ\text{C}$  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 (anti-sense oligonucleotide, ASODN) 序列为  $\text{p-AAC GTT GAG GGG CAT}$ , 该序列针对 *c-myc* 基因核苷酸序列 2298~2312, 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  $\text{p-AAC GAG TTG GGG CAT}$ , 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 ( $\text{IC}_{50}$ ) 的测定

0.25%胰酶-EDTA 消化 MCF-7/Adr 和 MCF-7,

调整细胞浓度至  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{l}$ /孔接种于 96 孔板,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养过夜。每孔加入不同浓度梯度 (0.05、0.5、5、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 DOX, 而后分别加入  $4 \mu\text{mol/L}$  *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  $100 \mu\text{l}$  培养液上清, 加入  $10 \mu\text{l}$  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  $100 \mu\text{l}$  二甲亚砜。待甲瓚溶解, 置 ELISA 检测仪  $570 \text{ nm}$  处读取  $D(\lambda)$  值, 按下式计算生长抑制率: 抑制率 =  $[1 - \text{实验组 } D(\lambda) \text{ 值} / \text{对照组 } D(\lambda) \text{ 值}] \times 100\%$ 。以抑制率为纵坐标 Y、药物浓度对数 ( $\lg X$ ) 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 ( $Y = b_0 \lg X + b_1$ ) 求出 DOX 单独或与反义寡核苷酸共孵育情况下的  $\text{IC}_{50}$ 。

## 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。

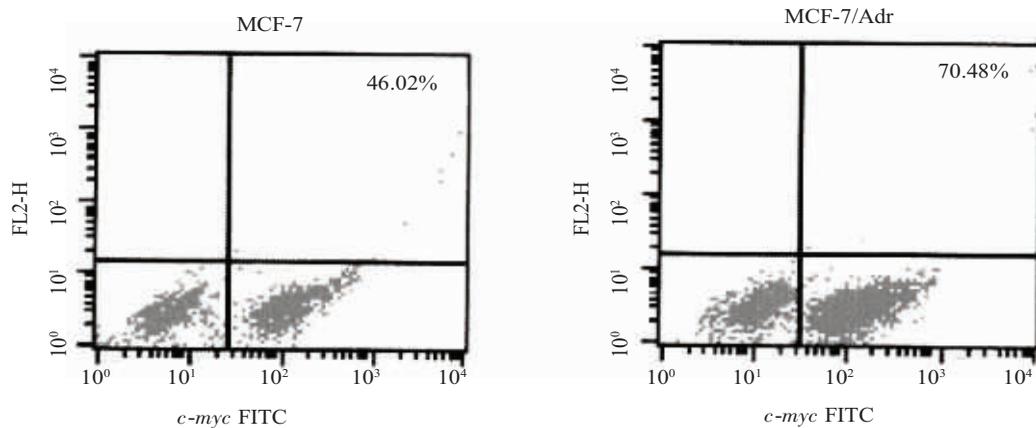


图 1 流式细胞仪检测 *c-myc* 在 MCF-7/Adr 和 MCF-7 细胞上表达

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,  $\text{IC}_{50}$  值为  $(22.00 \pm 1.92) \mu\text{mol/L}$ ; 在 *c-myc* MMODN 共孵育情况下,  $\text{IC}_{50}$  值为  $(20.60 \pm 3.20) \mu\text{mol/L}$ ; 但与 *c-myc* ASODN 共孵育时,  $\text{IC}_{50}$  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,  $\text{IC}_{50}$  值为  $(0.15 \pm 0.04) \mu\text{mol/L}$ , 与 *c-myc* ASODN 共孵育时,  $\text{IC}_{50}$  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<sup>[5]</sup>。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<sup>[2]</sup>。Nesbit 等<sup>[6]</sup>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<sup>[7]</sup>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<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>。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 IC<sub>50</sub> 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<sup>[10]</sup>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(5), 73: 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.

## 科学家首次观测到病毒侵入细胞的过程

德国科学家最近观测到病毒侵入细胞的过程,并用荧光单分子检测技术将其清楚地记录下来。这是人类首次具体观测到这一过程,其成果将有助于利用基因疗法开发出更好的抗病毒药物。

单分子检测技术是为对单个荧光染色分子进行成像分析或其他描述而发展起来的技术。以前,人们只能对研究对象进行整体观测,因而有许多问题无法解决,而近来科学家们解决了通过对单分子的检测而获得整体观测对象相关状况这一难题,使得单分子检测技术得到较大发展,并在生物学领域获得广泛应用。

德国慕尼黑大学的克里斯托夫·布罗伊希勒及其领导的研究小组首先对一种名为腺体联合病毒的单个分子进行荧光染色,然后利用特殊的显微镜跟踪拍摄其侵入细胞的过程。被染色的单个分子尺寸仅为单个病毒的 1/25。科学家们随后使用 10 到 1 000 个这种病毒模拟病毒侵入海拉细胞(人体宫颈癌传代细胞)的过程,这种方法对观测结果影响甚小。科学家观测到,病毒首先在细胞外数次“撞击”细胞膜,每次接触时间在 1 秒左右。病毒经过 5 次“撞击”后,终于部分地进入了细胞。在其后的几分钟内,病毒侵入了细胞核。科学家发现,病毒进入细胞后到最终侵入细胞核的时间要比原先认为的短,猜测病毒可能是“聪明”地利用了细胞内的某些“输送管道”。