

· 论 著 ·

## c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞增殖凋亡的影响\*

张巧琳, 徐 新, 刘 琪, 罗春丽<sup>△</sup>

(重庆医科大学检验系教育部重点实验室 400016)

**摘要:**目的 探讨 c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞增殖、凋亡的影响。方法 采用 MTT 检测 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞增殖的影响,FCM 检测 10058-F4 对细胞周期及凋亡的作用,Western blot 法进一步检测 10058-F4 对 c-Myc 及其靶基因 p21、p27 和 Bcl-2 蛋白表达改变。结果 10058-F4 可抑制 786-0 细胞增殖且呈浓度、时间依赖性,阻止细胞周期于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,且可诱导细胞凋亡,能明显分别下调和上调 c-Myc 及其靶基因 p21、p27 及 Bcl-2 蛋白表达。结论 c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 能抑制肾癌 786-0 细胞增殖并诱导其凋亡,并呈时间依赖性和浓度依赖性。

**关键词:** c-Myc; 10058-F4; 肾癌; 增殖; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.019

中图分类号: R737.11; R73-361

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)22-3049-02

## Effect of small-molecule c-Myc inhibitor 10058-F4 on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma 786-0 cells\*

ZHANG Qiao-lin, XU Xin, LIU Qi, et al.

(Key Laboratory of Clinical Diagnosis of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma 786-0 cells. **Methods** Renal cell carcinoma 786-0 cells proliferation and its relationship with concentration and time were detected by MTT assay, the effects of 10058-F4 on cell cycle and cell apoptosis were determined by FCM, the expression of c-Myc, p21, p27 and Bcl-2 were analyzed by Western blot. **Results** The proliferation of renal cell carcinoma 786-0 cells were significantly inhibited by 10058-F4 in a concentration-dependent and time-dependent, and 10058-F4 arrested cell cycle at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and induced cell apoptosis, and deregulated the expression of c-Myc and its target gene p21, p27 and upregulated the expression of Bcl-2. **Conclusion** Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, can inhibit the proliferation and induce apoptosis of renal cell carcinoma 786-0 cells in a dose and time-dependent.

**Key words:** c-Myc; 10058-F4; renal cell carcinoma; proliferation; apoptosis

c-Myc 是从鸡病毒 V-myc 癌基因和同源物中分离出来的原癌基因,在细胞增殖、凋亡和分化等进程中起重要作用。c-Myc 因基因扩增、染色体易位、突变在多种肿瘤中表达失控,参与肿瘤进程<sup>[1]</sup>。通过微阵列和实时定量 PCR 发现 c-Myc 在肾癌中因基因扩增和染色体易位呈高表达,其表达量与患者的预后相关<sup>[2]</sup>。有学者进一步研究证实, c-Myc 通路在肾癌中呈持续活化状态,体外 RNAi 技术沉默 c-Myc 基因能有效抑制肾癌增殖、凋亡并可调节相应下游分子<sup>[3]</sup>,但基因沉默对于肿瘤细胞的靶向作用有限。

c-Myc 编码产物为转录因子,主要与 Max 蛋白形成二聚体调节相应下游分子从而调节肿瘤进程。10058-F4 是 c-Myc 小分子抑制剂,可下调 c-Myc 蛋白表达并特异性阻止 c-Myc-Max 复合物形成<sup>[4-6]</sup>。因此,本次实验选用 c-Myc-Max 二聚体小分子抑制剂 10058-F4 研究其对肾癌 786-0 细胞增殖和凋亡的作用,探讨其潜在治疗作用。

**1 材料与方**

**1.1 细胞系和主要试剂** 786-0 细胞株由本室保存, anti-c-Myc、anti-Bcl-2、anti-p27、anti-p21 和 anti-β-actin 的一抗及辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 均购自 Santa Cruz 公司, RPMI1640 和小牛血清购自 Gibco 公司, MTT 购自美国 Sigma 公司, 10058-F4 购自 Sigma 公司。

**1.2 细胞培养** 人肾细胞癌 786-0 细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、含 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的培

养箱中培养,常规换液传代。

**1.3 MTT 检测** 取对数期生长的 786-0 细胞 2~5×10<sup>4</sup> 个/mL 100 μL 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后加入图 1A 所示浓度的 10058-F4,将其每组细胞做 5 个复孔,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,培养不同的时间点后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加 150 μL DMSO,用酶标仪 570 nm 处测吸光度值。细胞增殖活力按公式计算:细胞生长抑制率=[1-(OD 实验-OD 调零)/(OD 对照-OD 调零)]×100%。

**1.4 FCM 检测** 取对数生长的 786-0 细胞接种于 50 mL 培养瓶中,待细胞贴壁后加入 60、100 μM 的 10058-F4,加药后继续培养细胞 24 h,用 0.25% 胰酶消化,PBS 洗 3 次,600×g 离心 5 min,加入 70% 乙醇固定细胞,1 000×g 离心 10 min 去固定液,加入碘化丙啶染色液[1×PBS,0.1% Trton X-100,碘化丙啶(20 μg/mL),RNase A(100 μg/mL)],室温染色 30 min,上流式细胞仪分析细胞周期,采用 PI/annexin-V 染色用于检测细胞凋亡,取 1×10<sup>5</sup> 个细胞加入 5 μL Annexin V-PE 及 10 μL 的 7-AAD,轻轻混匀,避光保存 20 min,加入 200 μL 缓冲液,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.5 Western blot 法检测** 细胞用预冷的 PBS 洗 3 次,用细胞刮收集细胞于离心管中,800×g 离心 5 min,转移到 EP 管中,3 000×g 离心 5 min,加入 RIPA 裂解液,冰上放 30 min,13 000×g 离心 30 min 收集上清液,用考马斯亮蓝于酶标仪上

测浓度,加入蛋白上样缓冲液 100 ℃ 变性 5 min,每个上样孔上相同浓度的蛋白,每孔约 50 μg,SDS-PAGE,半干转于 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 3 h,一抗 4 ℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜,3 次/10 min,ECL 显色。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 10058-F4 抑制肾癌细胞 786-0 增殖及 c-Myc 蛋白表达

MTT 检测结果显示,加入 c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 后,抑制肾癌细胞 786-0 增殖,且呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ,图 1A) 和时间依赖性 ( $P < 0.05$ ,图 1B),Western blot 法检测结果显示 10058-F4 能明显抑制 c-Myc 蛋白水平表达,并呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ),见图 1C。

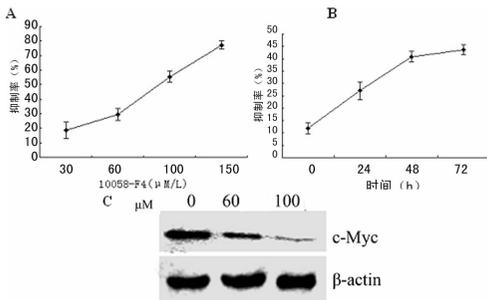
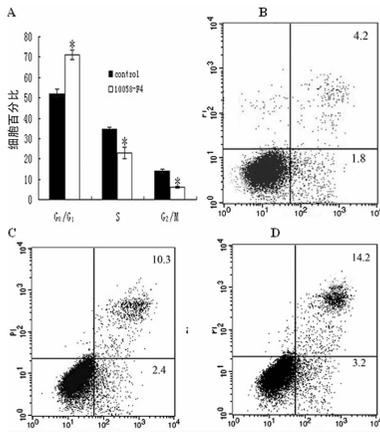


图 1 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞增殖及 c-Myc 蛋白表达的影响



A: 细胞周期分布 ( $P < 0.05$ ); B、C、D: 流式细胞术检测细胞凋亡, B 为对照组, C 为 60 μM 10058-F4, D 为 100 μM 10058-F4。

图 2 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞周期和凋亡的影响

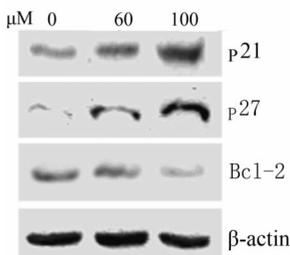


图 3 Western blot 法检测 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞 p21、p27 和 Bcl-2 蛋白表达

**2.2 10058-F4 阻止 786-0 细胞周期并诱导凋亡** 用流式细胞仪检测细胞周期结果显示,60 μM 和 100 μM 的 10058-F4 均可阻止 786-0 细胞周期于  $G_0/G_1$  期 ( $P < 0.05$ ),见图 2A,进一步 PI/annexin-V 双染流式检测显示,100 μM 的 10058-F4 作用

786-0 细胞 24h 可诱导细胞凋亡,但作用不明显,进一步检测其 48 h 时细胞凋亡,发现其凋亡细胞增多,对照组细胞凋亡率为 (6.2 ± 0.91)%,60 μM 的 10058-F4 细胞凋亡率为 (13.07 ± 0.64)%,100 μM 的 10058-F4 细胞凋亡率为 (17.97 ± 0.55)% ( $P < 0.05$ ),见图 2。

**2.3 10058-F4 影响 p21、p27 和 Bcl-2 蛋白表达** Western blot 法检测结果显示,10058-F4 可上调 p21 和 p27 蛋白表达,并明显下调 Bcl-2 蛋白,且呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ),见图 3。

## 3 讨论

c-Myc 及其所调节的信号通路在肾癌的发生过程中发挥着重要的作用,抑制 c-Myc 表达能有效抑制肾癌生长<sup>[3,7]</sup>。目前主要采用 RNAi 技术和寡义核苷酸链等抑制 c-Myc 表达,但这些技术对肿瘤靶向具有局限性。研究发现,c-Myc 主要与 Max 等形成二聚体调节肿瘤恶性生物学行为,小分子抑制剂 10058-F4 可特异性抑制 c-Myc-Max 形成。本次研究采用 c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 作用于肾癌 786-0 细胞,发现其能有效抑制肾癌细胞增殖并诱导其凋亡。

c-Myc 蛋白属于具有 DNA 结合域的转录因子,对细胞周期起正向调节作用,c-Myc 基因激活导致大量  $G_0$  期细胞提前进入细胞周期,推动  $G_0/G_1$  期细胞向 S 期转变<sup>[8]</sup>。本研究发现,c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4,抑制肾癌 786-0 细胞增殖并明显阻止细胞周期于  $G_0/G_1$ 。p21、p27 是细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白,通过抑制 CDK 的激活使细胞周期阻止于  $G_1$  期,同时 p21、p27 是 c-Myc 的靶基因<sup>[9]</sup>。10058-F4 可明显上调 p21、p27 蛋白表达水平。p21、p27 作为 c-Myc 的靶基因,当 c-Myc 蛋白水平降低和 Max 形成二聚体减少,对下游分子的调节作用减弱,p21、p27 所受抑制作用相应减弱,表达上调。10058-F4 有可能是通过抑制 c-Myc 活性及与 Max 二聚体的形成,间接上调 p21、p27 蛋白表达,从而抑制肾癌细胞增殖,阻止细胞周期于  $G_0/G_1$ 。进一步研究发现,10058-F4 可诱导 786-0 细胞凋亡并可下调 c-Myc 凋亡相关下游分子 Bcl-2 蛋白水平,但在 24 h 时作用并不明显,随着时间延长,诱导凋亡作用增加,呈现时间依赖性,这可能是由于细胞内被抑制的目标蛋白有一定的半衰期,只有当目标蛋白降解以后,10058-F4 的抑制效应才显现出来。

c-Myc 在多种肿瘤中表达失控,如参与肿瘤的发生,其中包括肾癌,下降 c-Myc 活性能有效阻止肿瘤进程。c-Myc 有望成为肿瘤治疗的新靶点,c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 特异性下调 c-Myc 表达,抑制 c-Myc 功能二聚体形成,间接有效调节 c-Myc 靶基因,有望为肾癌治疗开辟新途径。

## 参考文献:

- [1] popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer[J]. J Cell Mol Med,2002,6(2):151.
- [2] Jon AJ, Lovisol O, Casati B, et al. Gene expression profiling of renal cell carcinoma: a DNA microarray analysis[J]. BJU Int,2006,98(1):205.
- [3] Tang SW, Chang WH, Su YC, et al. MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells[J]. Cancer Letters,2009,273(1):35.
- [4] Berg T, Cohen SB, Desharnais J, et al. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibro- (下转第 3068 页)

结合本组病例,并复习文献,作者分析输尿管镜术后大出血常见原因主要有:(1)输尿管黏膜损伤,尤其当结石较大时,输尿管镜反复进出并反复使用鳄嘴钳取石,易致输尿管黏膜出血、水肿,增加输尿管损伤的概率。(2)当结石合并息肉形成时,由于结石的反复摩擦刺激或结石嵌顿,周围炎症水肿明显,处理结石或钳夹息肉容易引起出血<sup>[3]</sup>。(3)结石位于输尿管下段,尤其是膀胱壁内段,增加进镜困难,可能导致输尿管开口或输尿管壁内段黏膜损伤撕裂而出血。(4)输尿管开口或输尿管下段狭窄,强行入镜可能导致输尿管开口或输尿管壁内段黏膜损伤撕裂而出血。本组有 2 例术后严重出血患者行电切镜清除血凝块后发现输尿管开口周围有明显活动性出血,电凝止血后出血即停止,回忆输尿管镜手术过程,考虑出血与输尿管开口或输尿管壁内段黏膜损伤撕裂有关。(5)当上尿路梗阻完全或梗阻时间较长时,输尿管或肾盂黏膜炎症水肿可能很重,术中为追求视野清晰,冲洗压力过大,尿路梗阻解除后,压力差可能导致肾盂或输尿管黏膜毛细血管广泛破裂出血。(6)当结石导致上尿路梗阻并继发感染,尤其感染较重时,可能加重出血。(7)双 J 管异物反复摩擦刺激引起出血。本组有 2 例都是术后恢复较好带双 J 管出院后 1~2 周才出现大出血的,考虑可能与双 J 管异物反复摩擦刺激或尿液反流感染加重有关。(8)患者凝血功能异常,可能导致异常的难以控制的出血。本组有 2 例术后严重出血患者术前合并肾功能不全,术后复查血常规,血小板减少,考虑出血可能与血小板减少凝血功能异常有关。(9)手术者对输尿管的解剖特点和疾病造成输尿管的病理改变不熟悉、加之经验不足、操作不够熟练、甚至粗暴操作,极容易引起输尿管损伤出血。Schuster 等<sup>[4]</sup>认为手术者经验不足与术后早期并发症增加明显相关。(10)手术适应证控制不好,输尿管上段结石行输尿管镜碎石困难和风险较大,输尿管损伤出血概率增加。(11)患者一般情况差,如合并严重贫血或低蛋白血症等,都可能增加手术风险。

如何防治输尿管镜术后严重出血,作者的策略和经验是:(1)当结石较大或位置较高时,应尽量原位碎石,尽可能将结石碎至 3 mm 以下,以便顺利排出,避免多次出、入镜及反复鳄嘴钳取石。(2)当结石合并息肉形成时,对于不影响视野的较小息肉不予特别处理;对于多发息肉或包裹结石的息肉,应在输尿管导管或斑马导丝引导下用钬激光切割处理,避免用异物钳撕扯。处理息肉时不要追求过于干净,以免增加输尿管壁损伤的危险性<sup>[5]</sup>。(3)结石位于输尿管下段,尤其是膀胱壁内段,致进镜困难时,应在输尿管导管或斑马导丝的引导下进镜,动作轻柔,遇到阻力时切忌盲目用力,应抽回导管或导丝少许,适当变动角度后再次试插<sup>[6-7]</sup>。(4)当输尿管开口或输尿管下段狭窄时,进镜困难时,应在输尿管导管或斑马导丝的引导下进镜,动作轻柔,必要时可用扩张器或镜体适度扩张,避免强行入镜。(5)术中注

意控制冲洗压力和冲洗时间,间断冲洗,适时放水减压,避免尿路梗阻解除后,压力差导致肾盂或输尿管黏膜毛细血管广泛破裂出血。(6)当结石继发感染,尤其感染较重时,应积极抗感染,术中注意控制冲洗压力和手术时间,必要时应用激素抗炎,尽量避免感染加重出血。(7)根据术中、术后情况决定,能拔尽量早拔,尽量避免留置双 J 管引起的出血和感染。保留时间异物反复摩擦刺激引起出血。(8)患者合并肾功能不全,凝血功能可能异常,尤其是血透后凝血功能更差,可能导致异常的、难以控制的出血。术前应积极纠正肾功,但应尽量避免血透后立即手术,且应尽量采取无肝素化血透。本组有 2 例术后严重出血患者术前、术后复查血常规,血小板减少,考虑出血可能与血小板减少凝血功能异常有关。(9)手术者应尽量熟悉输尿管的解剖特点和疾病造成输尿管的病理改变,术前估计各种手术困难,术中仔细操作。(10)把握手术指征,输尿管上段结石绝大多数可选择经皮肾镜碎石术,碎石成功率和手术困难及风险相对较小。(11)术前尽量改善患者的一般情况,术中应更加小心谨慎,防范手术风险。(12)若发生术后严重出血,应积极寻找原因,同时止血、输血、抗感染治疗,必要时果断再手术治疗。

综上所述,输尿管镜术后大出血虽然发生可能较小,但一旦发生,后果可能十分严重,故应予以重视。术前充分准备和术中谨慎熟练操作及术后妥善及时地处理对防治输尿管镜术后大出血有肯定作用

#### 参考文献:

- [1] Hollenbeck BK, Schuster TG, Faerber GJ, et al. Safety and efficacy of same-session bilateral ureteroscopy[J]. J Endourol, 2003, 17: 881.
- [2] Johnson DB, Pearle MS. Complications of ureteroscopy [J]. Urol Clin North Am, 2004, 31(1): 157.
- [3] 陈刚, 吴小候, 唐伟, 等. 输尿管镜下钬激光治疗合并息肉的输尿管结石[J]. 重庆医学, 2009, 38(17): 2144.
- [4] Schuster TG, Hollenbeck BK, Faerber GJ, et al. Complications of ureteroscopy: analysis of predictive factors[J]. J Urol, 2001, 166(2): 538.
- [5] 桑乾宏, 任胜强, 郭旭明, 等. 输尿管结石并发息肉的输尿管镜处理[J]. 临床泌尿外科杂志, 2004, 19(5): 300.
- [6] 朱光炜, 管刚云, 陈光. 经尿道输尿管镜碎石取石术并发症分析[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2009, 3(6).
- [7] Anagnoston T, Tolley D. Management of ureteric stone [J]. Eur Urol, 2004, 45(6): 714.

(收稿日期: 2010-08-25)

(上接第 3050 页)

- blasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 3830.
- [5] Yin X, Giap C, Lazo JS, et al. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function[J]. Oncogene, 2003, 22: 6151.
  - [6] Mo H, Henriksson M. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 6344.
  - [7] Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular carcinoma[J]. Nature, 2004,

431: 1112.

- [8] Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, et al. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry[J]. Cell Cycle, 2008, 7(8): 1054.
- [9] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment[J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(2): 65.
- [10] Sawyers CL. Making progress through molecular attacks on cancer[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005, 70: 479.

(收稿日期: 2010-08-25)