

## c-Myc 基因在人非小细胞肺癌中的表达及基因沉默抑制 H1299 细胞效果的实验研究

王亚勤<sup>1</sup>, 刘翔<sup>1</sup>, 吴晨<sup>2</sup>, 唐义虎<sup>1</sup>, 吴延虎<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院胸心外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>常州市第一人民医院肿瘤中心, 江苏 常州 213000)

**[摘要]** 目的:分析人非小细胞肺癌(non-small cell carcinoma, NSCLC)组织中 c-Myc 基因的表达,探讨沉默 c-Myc 基因在非小细胞肺癌基因治疗中的前景。方法:应用实时荧光定量 PCR 法检测 84 例非小细胞肺癌组织及其相应癌旁组织中 c-Myc 基因 mRNA 的表达情况。通过脂质体 LipofectAMINE2000 将 c-Myc 基因 siRNA 瞬时转染至非小细胞肺癌 H1299 癌株细胞中,顺铂(Cisplatin, cis)药物毒性实验验证 c-Myc 基因沉默对肿瘤细胞的抑制效果。应用 RT-PCR 检测 H1299 细胞中 c-Myc 基因 RNA 的表达, CCK-8 法检测抑制细胞的效果。结果:非小细胞肺癌组织中 c-Myc 基因 mRNA 的表达水平高于相应的癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。c-Myc siRNA 瞬时转染后的 H1299 细胞中, c-Myc 基因 mRNA 的表达水平显著下降( $P < 0.05$ )。将 c-Myc 基因沉默和顺铂联合使用,还可以显著提高顺铂对 H1299 细胞增殖的抑制效果( $P < 0.05$ )。结论:c-Myc 基因在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显高于相应癌旁组织,沉默 c-Myc 基因能显著提高顺铂抑制非小细胞肺癌 H1299 细胞增殖的作用, c-Myc 基因有可能成为 NSCLC 基因治疗的新靶点。

**[关键词]** 非小细胞肺癌;基因治疗;c-Myc 基因

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)02-151-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160205

## The expression of c-Myc in non-small cell lung cancer and the effect of its silencing in inhibiting tumor cells

Wang Yaqin<sup>1</sup>, Liu Xiang<sup>1</sup>, Wu Chen<sup>2</sup>, Tang Yihu<sup>1</sup>, Wu Yanhu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Carcinoma, Changzhou First Hospital, Changzhou 213000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of c-Myc in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, and to explore the prospects of the c-Myc gene silencing in NSCLC gene therapy. **Methods:** The expression levels of c-Myc mRNA in 84 NSCLC tissues and the corresponding para-cancerous tissues were detected by RFQ-PCR (real-time fluorescence quantitative-PCR). C-Myc siRNA was transfected into NSCLC H1299 cells by LipofectAMINE 2000. Cisplatin toxicity experiments further validated effect of inhibiting tumor cells with c-Myc gene silencing. The expression level of c-Myc mRNA in H1299 cells was detected by RT-PCR, and the effect of inhibiting H1299 cells was detected by CCK-8 (Cell Counting Kit-8). **Results:** The expression level of c-Myc mRNA in NSCLC tissues was higher than that in the corresponding para-cancerous tissues ( $P < 0.05$ ). C-Myc siRNA was successfully transfected into NSCLC H1299 cells. After transfection, the expression level of c-Myc mRNA was down-regulated in H1299 cells. Effect of inhibiting tumor cells increased significantly when the c-Myc gene silencing and cisplatin were in combination ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression level of c-Myc mRNA in NSCLC tissues is higher than that in the corresponding para-cancerous tissues. The lower expression of c-Myc can significantly inhibit NSCLC H1299 cells. It is suggested that c-Myc may act as an oncogene in NSCLC gene therapy.

**[Key words]** non-small-cell lung carcinoma; gene therapy; c-Myc gene

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 151-154]

**[基金项目]** 江苏省六大人才高峰(2012-WS-108)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wuyanhu@njmu.edu.cn

非小细胞肺癌(non-small cell carcinoma, NSCLC)的基因治疗近年来引人注目,而认识、分析和整合 NSCLC 发生发展中各个可能相关基因,则是 NSCLC

基因治疗的基础。C-Myc 基因是 myc 基因家族的重要成员之一,与多种肿瘤发生发展有关,目前认为胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、何杰金氏病及头部肿瘤等都有 c-Myc 基因的扩增或过度表达<sup>[1-2]</sup>。近年来一些研究证实了在 NSCLC 组织中也有 c-Myc 基因的异常表达,但其在 NSCLC 发生发展的作用未见相关报道<sup>[3-4]</sup>。本研究进一步证实 c-Myc 基因在 NSCLC 组织中的异常表达,并探讨沉默 c-Myc 基因在 NSCLC 基因治疗中的前景。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集 2011 年 12 月—2012 年 6 月在南京医科大学第一附属医院胸心外科行手术治疗并经病理科检验确诊为 NSCLC 的组织标本及其相应的癌旁组织(距离癌组织边缘 5 cm 以上,且病理证实为正常肺组织)标本各 84 例。其中男 67 例,女 17 例;年龄 >50 岁 71 例,<50 岁 13 例;按 2004 年 WHO 制定的肺和胸膜肿瘤分类标准进行组织学分型和分化评估,鳞癌 59 例、腺癌 25 例;按 2009 年国际抗癌联盟制定的标准进行 TNM 分期, I 期 50 例、II 期 26 例、III 期 8 例;无淋巴结转移者 54 例,有淋巴结转移者 30 例(表 1)。84 例患者手术前均未进行化疗或放疗,所有标本的收集均获得患者及其家属的同意并签署协议书。本研究获得南京医科大学第一附属医院伦理委员会的批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测 NSCLC 组织及其相应癌旁组织中 c-Myc mRNA 的表达

将手术获得的 84 例 NSCLC 组织及其相应的癌旁组织置于 -80℃ 冰箱中保存备用。实验时取出组织,按照 TRIzol RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司,美国)说明书提供的方法提取组织 RNA,并用 Beckman Coulter DU800 分光光度仪(Beckman 公司,美国)测定 RNA 的浓度和纯度。按 Primescript™ RT 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)说明书提供的方法将 RNA 反转录成 cDNA,反应条件为 37℃ 15 min、85℃ 5 s,将反应产物置于 4℃ 冰箱中保存备用。按 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)说明书提供的方法,以获得的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。c-Myc 和  $\beta$ -actin 引物序列如下:c-Myc 正向 5'-GGCTCCTGGCAAAGGTCA-3',反向 5'-AGTTGTGCTGATGTGTGGAGA-3'; $\beta$ -actin 正向 5'-TGTGCCCATCTACGAGGGGTATGC-3',反

向 5'-GGTACATGGTGGTGGCCGACAGACA-3'。反应体系(Sybr green 法,20  $\mu$ L):Ex-Taq(2 $\times$ )10  $\mu$ L,引物(上下游)各 0.4  $\mu$ L,DNA 模板 2.0  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L;反应条件:50℃ 5 min + 95℃ 10 min + 45 个循环(95℃ 15 s,60℃ 2 min)。实时定量 PCR 反应在美国 ABI 公司 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上完成,得到 Ct 值后用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算的 c-Myc 的相对表达量。

#### 1.2.2 细胞培养和 siRNA 转染

H1299 (CRL-5803TM NSCLC 细胞系来自美国模式培养物集存库(ATCC)。细胞置于湿润的 37℃,5%CO<sub>2</sub> 环境中生长,并且在含有 10% 胎牛血清(Gibco 公司,美国)的 RPMI-1640(Gibco 公司,美国)中培养。细胞以 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,并培养 24 h 后 H1299 细胞处于对数生长期,可用于转染。用脂质体,按照 Signal Silenc™ c-Myc siRNA (#6341,Cell Signaling Technology 公司,美国)和 Signal Silenc™ control siRNA (#6568,Cell Signaling Technology 公司,美国)的转染步骤,将细胞和转染试剂(lipofectamin 2000,Invitrogen 公司,美国)共培养 6h 后换成新鲜完全培养基继续培养以便完成其他实验,siRNA 浓度分别为 25、50 和 75 nmol/L,control siRNA 作为对照。RT-PCR 检测 c-Myc mRNA 在 H1299 细胞中的表达状况,反映 c-Myc siRNA 瞬时转染效果。

#### 1.2.3 细胞抑制和药物毒性实验(CCK-8 法)

培养至对数生长期的 H1299 细胞,以 4 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种到 96 孔板,24 h 后经 50 nmol/L c-Myc siRNA 转染和(或)加顺铂(cis,5.0  $\mu$ g/mL)处理。分组如下:blank 组(空白对照组,加等量培养基不含 H1299 细胞);control + cis 组(H1299 细胞经顺铂单独处理);lipo+cis 组(H1299 细胞经不携带 c-Myc siRNA 脂质体 LipofactAMINE2000 和顺铂共同处理);control siRNA+cis 组(对照 siRNA,不针对任何靶点的无意义 siRNA 和顺铂共同处理 H1299 细胞);c-Myc siRNA+cis 组(c-Myc siRNA 和顺铂共同处理 H1299 细胞);control 组(未经处理的 H1299 细胞)。转染前和转染后 0、24、36、48 和 60 h 加入 CCK-8(中国碧云天公司),继续培养 4 h 后,450 nm 光下检测吸光度(值),计算细胞抑制率(%)=(1-实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) $\times$ 100%,数据处理时去掉最大值和最小值,以避免人为操作误差。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对实验结果进行统计分

析,实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,实时荧光定量 PCR 检测 c-Myc mRNA 在肺癌及其相应癌旁组织中的表达结果采用配对 *t* 检验,c-Myc 基因沉默对肿瘤细胞抑制作用采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

NSCLC 组织中 c-Myc mRNA 表达水平与患者的性别、年龄、组织学分型、TNM 分期以及有无淋巴结转移无相关性(表 1)。

表 1 c-Myc 的表达与 NSCLC 临床及病理学特征的关系  
Table 1 Relationship between the expression of c-Myc and clinical and pathological features of NSCLC

临床特征	例数	mRNA 相对表达水平( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	$P$ 值
年龄(岁)			0.693
≤ 50	13	10.66 ± 6.18	
> 50	71	12.63 ± 1.82	
性别			0.824
男	67	12.53 ± 2.20	
女	17	11.52 ± 1.91	
组织学分型			0.869
腺癌	25	11.87 ± 4.16	
鳞癌	59	12.52 ± 1.87	
临床分期			0.853
I	50	13.17 ± 2.60	
II	26	11.08 ± 2.92	
III	8	11.13 ± 1.85	
转移			0.551
有	30	10.88 ± 3.49	
无	54	13.13 ± 2.02	

### 2.1 NSCLC 组织中 c-Myc mRNA 的表达水平明显高于癌旁组织

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,在 84 例 NSCLC 组织中,c-Myc mRNA 的相对表达量[(6.28 ± 2.31) × 10<sup>3</sup>]是相应癌旁组织相对表达量[(3.54 ± 2.14) × 10<sup>3</sup>]的 1.77 倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 c-Myc siRNA 成功转染 H1299 细胞

转染后 48 h,显著抑制 H1299 细胞中 c-Myc RNA 的表达,并与浓度成正比,72 h 后,抑制作用消失(图 1)。

### 2.3 c-Myc 基因沉默和顺铂共同作用可以显著提高顺铂对 H1299 细胞增殖的抑制效果

药物毒性实验结果表明将 c-Myc 基因沉默和顺铂联合使用,可以进一步提高顺铂对 H1299 细胞增殖的抑制作用。在 60 h 时 control + cis 组、lipo+cis 组、

control siRNA+cis 组和 c-Myc siRNA+cis 组的吸光度值均显著高于 control 组 ( $P < 0.05$ ),并且 c-Myc siRNA+cis 组吸光度值显著高于其余各组 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

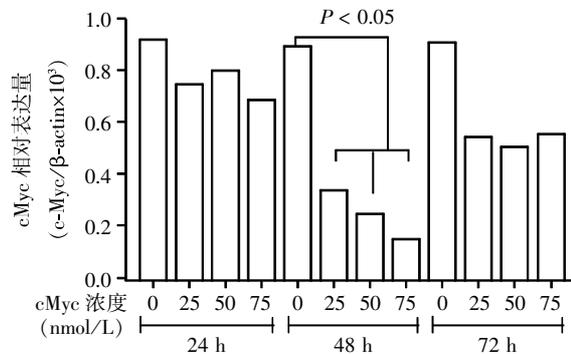


图 1 real-time PCR 检测 c-Myc siRNA 抑制 H1299 细胞中 c-Myc RNA 的表达

Figure 1 c-Myc siRNA inhibits expression of c-Myc RNA in H1299 detected by real-time PCR

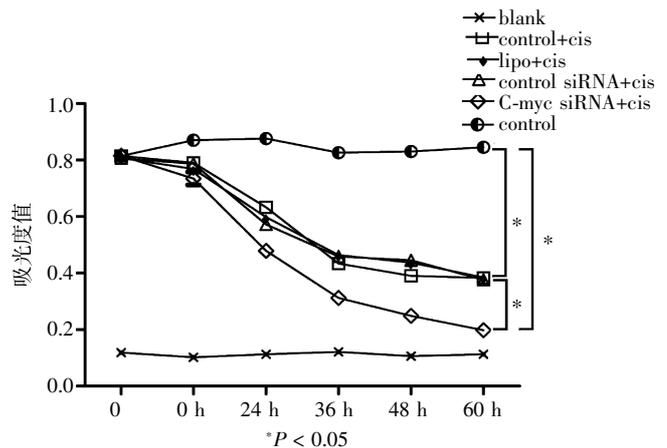


图 2 CCK-8 检测 siRNA 和顺铂处理后 H1299 细胞增殖抑制情况

Figure 2 Cell proliferation inhibition of H1299 treated by siRNA and cisplatin

## 3 讨论

本研究发现,c-Myc 在 NSCLC 组织中的表达量显著高于相应癌旁组织,c-Myc 基因沉默抑制 H1299 细胞增殖,并且效果明显。顺铂作为治疗 NSCLC 最经典的化疗药物之一,抑制 NSCLC 细胞增殖的作用明显,而将 c-Myc 基因沉默和顺铂联合使用,甚至可以显著提高顺铂抑制 H1299 细胞增生的效果。因此本文推测 c-Myc 基因在 NSCLC 中扮演重要的癌基因角色,有可能成为 NSCLC 基因治疗的新靶点,有进一步研究的意义。

NSCLC 的发生、发展是一个多步骤、多基因参

与的过程,包括原癌基因的活化、抑癌基因的失活等许多相关基因的突变,参与肿瘤的启动、促进、发展和转移等各个阶段。目前有关权威研究机构对肺癌细胞的遗传特征进行了综述性的描绘,总结了肺癌遗传变异图谱,发现人类肺癌中五十多个基因组区域会时常发生增加或删减。这一肺癌基因组图谱为理解肺癌这种严重的疾病提供了一个系统性的认识,目前已经成为复杂癌症遗传机制研究中的一项领军研究<sup>[5]</sup>。

NSCLC 基因治疗的实质就是通过分子生物技术,直接纠正肿瘤细胞基因的结构和(或)功能缺陷,或者间接通过增强宿主对肿瘤的杀伤力和机体的防御功能来治疗肿瘤,主要包括以下几个方面:①阻止原癌基因过量表达,针对肿瘤细胞癌基因异常活化设计的反义核酸技术,可以有效调节肿瘤细胞基因表达,其治疗的靶基因有癌基因、生长因子及其受体、细胞信号转导系统、细胞周期调控物质、酶类等<sup>[6]</sup>;②补偿抑癌基因表达治疗,目前应用最广的抑癌基因是 p53 基因<sup>[7]</sup>;③自杀基因治疗<sup>[8]</sup>;④抗血管生成基因治疗,主要通过抑制肿瘤血管的生成,抑制肿瘤的生长和转移,目前抗血管生成基因治疗以抑制血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导肿瘤血管生成作用为热点<sup>[9]</sup>;⑤免疫基因治疗<sup>[10]</sup>。

c-Myc 作为一种原癌基因,在调节 DNA 合成、细胞凋亡、分化及细胞周期的进程中起重要作用。c-Myc 基因的异常表达是癌变过程中较早出现的分子改变,与肿瘤的启动及癌性程度密切相关。c-Myc 基因还能触发并维持血管内皮生长因子(VEGF)的表达,而其缺失可以引起 VEGF 表达的缺失,导致血管发生和生成停滞<sup>[11]</sup>。因此,c-Myc 与肿瘤血管新生有关,具有调控血管生长的作用,在促进肿瘤生长过程中发挥着关键作用。

总之,NSCLC 的基因治疗是个复杂而有前途的系统工程,有待于每个和肺癌相关癌基因及其作用的明确,即肺癌基因图谱的描绘成功,也包括了 c-Myc 基因。虽然本研究证实了 c-Myc 基因在 NSCLC 中的异常表达,并且通过体外实验证明了其对 NSCLC 癌株细胞增殖的抑制作用,其效果可

以和顺铂的杀伤效果相当。但还不能确定它在 NSCLC 的发生、发展中的地位和作用,还有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Delgado MD, León J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia[J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(6): 605-616
- [2] Cavalheiro GR, Matos-Rodrigues GE, Gomes AL, et al. C-myc regulates cell proliferation during lens development. [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87182
- [3] Rapp UR, Korn C, Ceteci F, et al. Myc is a metastasis gene for Non-Small-Cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e6029
- [4] Krysan K, Kusko R, Grogan T, et al. PGE2-driven expression of c-Myc and oncomiR-17-92 contributes to apoptosis resistance in NSCLC [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(5): 765-774
- [5] Govindan R, Ding L, Griffith M, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never smokers [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1121-1134
- [6] Reungwetwattana T, Dy GK. Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer [J]. *J Carcinog*, 2013, 12(1): 22
- [7] Vachani A, Moon E, Wakeam E, et al. Gene therapy for lung neoplasms [J]. *Clin Chest Med*, 2011, 32(4): 865-885
- [8] Zarogoulidis P, Darwiche K, Sakkas A, et al. Suicide gene therapy for cancer-current strategies [J]. *J Genet Syndr Gene Ther*, 2013, 4: 16849
- [9] Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, et al. EGFR-Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Focus on EGFR oncogenic mutation [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(3): 320-330
- [10] Fridlender ZG, Sun J, Singhal S, et al. Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(11): 1947-1959
- [11] Baudino TA, McKay C, Samain HP, et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(19): 2530-2543

[收稿日期] 2015-06-13