

异氟醚下调 MYC 表达抑制高级别脑胶质瘤细胞增殖转移

尚利伟, 苗润宏, 常书峰

洛阳市第三人民医院 麻醉科, 河南 洛阳 471002

摘要: **目的** 探究异氟醚对高级别脑胶质瘤细胞 MYC 基因表达及细胞增殖转移能力的影响。**方法** 分别采用含 2%异氟醚的气体环境及常规气体环境 (5% CO₂) 培养对数生长期的人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 6 h, 作为异氟醚组及对照组; CCK-8 实验检测两组细胞气体暴露完成后 0、24、48、72 h 相对增殖能力; Transwell 侵袭及迁移实验检测两组细胞侵袭及迁移能力; Western Blotting 检测两组细胞 C-Myc 及 N-Myc 的蛋白表达。**结果** 异氟醚组细胞于暴露完成后 48、72 h 时增殖能力较对照组细胞显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 异氟醚组穿透基质胶的侵袭细胞数、穿过微孔的迁移细胞数均较对照组显著减少, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$ 、 0.001); 异氟醚组 C-Myc 及 N-Myc 的表达较对照组均显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 异氟醚可通过下调 C-Myc 及 N-Myc 基因的表达, 抑制人高级别脑胶质瘤细胞的增殖转移。

关键词: 异氟醚; 高级别脑胶质瘤; MYC 基因; 细胞增殖及转移; SHG-44

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 06- 1026 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.015

Isoflurane inhibits proliferation and metastasis of high grade glioma cells by down-regulating expression of MYC gene

SHANG Liwei, MIAO Runhong, CHANG Shufeng

Luoyang Third People's Hospital, luoyang 471000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of isoflurane on the expression of MYC gene and cell proliferation and metastasis in high grade glioma cells. **Methods** The gas environment containing 2% isoflurane and conventional gas environment (5% CO₂) for the cultivation of human glioma cell line SHG-44 6 h in logarithmic growth phase, as the isoflurane group and the control group. CCK-8 assay detected the relative proliferation ability of two groups of cells in 0, 24, 48, and 72 h. Transwell invasion and migration assay detected invasion and migration ability of two groups. Western blotting assay detected the expression of C-Myc and N-Myc in two groups. **Results** The proliferation ability of isoflurane group was decreased compared to control group in 48 and 72 h, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The number of invasion cells through Matrigel in isoflurane group was significantly reduced compared to control group, and the number of migrating cells through chamber in isoflurane group was significantly reduced compared to the control group cells, the difference was statistically significant ($P < 0.01$ and 0.001). The expression of C-Myc and N-Myc in isoflurane group were significantly reduced compared to the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Isoflurane can inhibit the proliferation and metastasis of human high grade glioma cells by down-regulating the expression of C-Myc and N-Myc genes, and has potential clinical value.

Keywords: isoflurane; high grade brain glioma; MYC gene; cell proliferation and metastasis; SHG-44

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤, 占全部颅内肿瘤的 30%~60%^[1], 根据其恶性程度可划分为低级别脑胶质瘤 (low grade gliomas, LGG) 及高级别脑胶质瘤 (high grade gliomas, HGG), 其中分化较差的 HGG 占有胶质瘤的 70%以上, 是主要的病理类型。HGG 细胞恶性程度高, 患者早期起病

隐匿且进展迅速, 导致多数患者预后较差, 患者 5 年总体生存率低至 5%^[2]。异氟醚作为常用的吸入性麻醉剂, 被发现可在体外影响多种恶性肿瘤的恶性行为^[3-4], 但其对 HGG 细胞的作用及相关机制尚不明确。C-Myc 及 N-Myc 是 MYC 基因家族的成员, 两者均可作为原癌基因在 HGG 中发挥作用^[5]。本实

收稿日期: 2017-11-30

第一作者: 尚利伟 (1973—), 男, 汉族, 河南伊川人, 副主任医师, 从事麻醉专业。E-mail: hongqiangl789@163.com

模拟探究异氟醚对HGG细胞MYC基因表达及增殖转移能力的影响,以期揭示异氟醚在HGG治疗中的潜在应用价值。

1 材料

1.1 实验细胞

人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 (美国模式培养物集存库)。

1.2 实验试剂

异氟醚(批号 07010,规格 100 mL,美国雅培制药有限公司);胎牛血清(FBS)、RPMI1640培养基(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白定量、CCK-8 试剂盒(上海碧云天公司);Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);IP 裂解液及蛋白酶抑制剂(上海碧云天公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);抗体(美国 abcam 公司),N-Myc (ab24193)、C-Myc (ab39688)、GAPDH (ab9485)、ECL 发光液(美国 Thermo Pierce 公司)。

1.3 实验仪器

生化培养箱、超净工作台(美国 Thermo Scientific 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司,Imark);高速离心机(德国 Eppendorf 公司,5417R);细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司,TC10);光学显微镜(日本 Olympus, CX23);ChemiDoc MP 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 实验细胞的培养及分组

SHG-44 细胞培养于含 100 g/L FBS 的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 及 100% 相对湿度的生化培养箱中培养,在超净工作台中严格无菌操作。本实验采用含 2% 异氟醚+5% CO₂ 的气体环境及常规气体环境(5% CO₂) 培养对数生长期的人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 6 h,分别作为异氟醚组及对照组,具体操作流程及气体浓度设置依据见参考文献^[7-8]。根据不同实验需要,将 SHG-44 细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶、96 孔板、24 孔板及 Transwell 小室中,再进行分组处理。

2.2 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

取生长状态良好的对数生长期 SHG-44 细胞接种于 2 块 96 孔板中(每孔 200 μL,细胞数 3×10⁴ 个每孔),设置 4 个时间点及 5 个重复孔,实验分组及操作同“2.1”项。以气体暴露完成后为 0 h 时间点,将 CCK-8 试剂与培养基 1:5 均匀混合,更换

96 孔板中两组细胞 0 h 时间点的培养基,生化培养箱中孵育 1 h,酶标仪检测两组细胞 450 nm 处的吸光度(A)值,以 24、48 及 72 h 时间点 A 值与 0 h 时间点 A 值之比表示细胞相对增殖能力。

2.3 Transwell 侵袭及迁移实验检测细胞转移能力

将 2 支 Transwell 小室置于 24 孔板中,无血清 RPMI1640 培养基 1:8 稀释 50 mg/L Matrigel 基质胶,加 100 μL 至小室中央,生化培养箱中放置 6 h。待基质胶凝固后,将按照“2.1”项方法处理好的异氟醚组及对照组细胞胰蛋白酶消化离心后,PBS 洗细胞 3 次,无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞,细胞计数仪进行计数,调整细胞浓度至 5×10⁶/mL,取 200 μL 细胞悬液加入包被基质胶的 Transwell 上室面,作为侵袭实验模型;另取 2 支未包被基质胶的 Transwell 小室置于 24 孔板中,同样加入 200 μL 细胞悬液,作为迁移实验模型,下小室加入 800 μL 含 100 g/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,置于生化培养箱中培养 24 h。棉签擦去上室面未穿出的细胞,10% 甲醇固定 10 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,PBS 洗净结晶紫,100× 光学显微镜下观察下室面细胞数,随机统计从中间和四周 5 个视野的总数,求其平均值及标准差。

2.4 Western Blotting 检测细胞 MYC 蛋白表达

细胞接种于 2 只 25 cm² 细胞培养瓶中,实验分组及操作同“2.1”项。异氟醚组及对照组消化离心细胞后,200 μL IP 裂解液及 2 μg 蛋白酶抑制剂重悬细胞,冰上裂解 2 h,15 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清,BCA 试剂盒检测两组细胞总蛋白浓度。取 50 μg 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,稳压 120 V,280 mA 稳流转至 PVDF 膜,10% 脱脂牛奶封闭 2 h,1:500 N-Myc 抗体孵育 49 kDa 处蛋白条带,1:1 000 C-Myc 抗体孵育 49 kDa 处蛋白条带,1:2 000 GAPDH 抗体孵育 37 kDa 处蛋白条带,均 4 °C 孵育 16 h,PBS 洗膜 3 次;1:2 000 二抗孵育 1 h,PBS 洗膜 3 次,ECL 发光液室温孵育条带 1 min,ChemiDoc MP 化学发光成像系统对条带进行曝光显影,扫描条带灰度值,以各组细胞 C-Myc 及 N-Myc 灰度值与内参基因 GAPDH 的比值表示 C-Myc 及 N-Myc 的相对表达情况。

2.5 统计学方法

统计分析采用 SPSS 19.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本 *t* 检验比较两组指标间的统计学差异。

3 结果

3.1 两组细胞增殖能力的比较

异氟醚组于气体暴露完成后 48、72 h 细胞增殖能力较对照组显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

3.2 两组细胞侵袭迁移能力的比较

Transwell 侵袭实验结果显示, 100 倍镜下, 异

氟醚组穿透基质胶的侵袭细胞数为 41.62 ± 7.34 个, 较对照组细胞 73.29 ± 10.40 个显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001, n = 5$), 见图 1A; Transwell 迁移实验结果显示, 100 倍镜下, 异氟醚组穿过微孔的迁移细胞数为 55.38 ± 9.11 个, 较对照组细胞 86.58 ± 13.63 个显著减少, 差异具有统计学意义 ($P = 0.001, n = 5$), 见图 1B。

表 1 两组细胞增殖能力的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Comparison of cell proliferation between two groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	相对增殖能力			
		气体暴露完成后 0 h	气体暴露完成后 24 h	气体暴露完成后 48 h	气体暴露完成后 72 h
对照	—	1.000±0.115	2.393±0.234	4.758±0.246	9.885±0.570
异氟醚	2%	1.000±0.187	2.130±0.259	4.062±0.473**	8.614±0.686**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

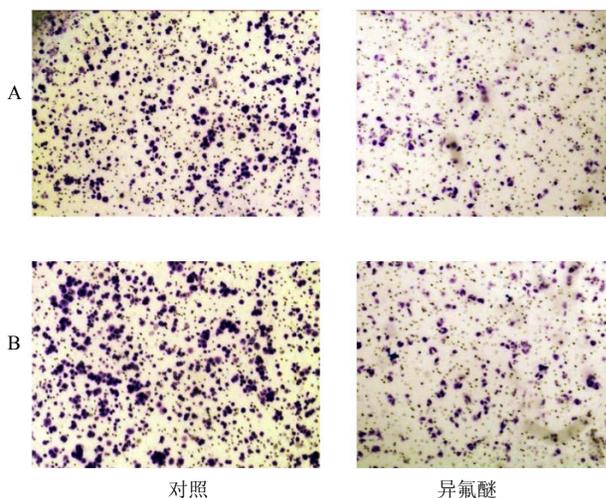


图 1 两组细胞侵袭迁移能力的比较 (100×)

Fig. 1 Comparison of cell invasiveness and migration between two groups (100×)

3.3 两组细胞 C-Myc 及 N-Myc 表达水平的比较

Western blotting 结果显示, 异氟醚组 C-Myc 相对表达量为 0.148 ± 0.033 , 显著低于对照组 0.329 ± 0.046 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.01, n = 3$); 异氟醚组 N-Myc 相对表达量为 0.052 ± 0.010 , 显著低于对照组 0.139 ± 0.021 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.001, n = 3$), 见图 2。

4 讨论

异氟醚具有麻醉诱导苏醒快、无积蓄及有效降低颅内压、扩张冠状动脉等优点, 目前已广泛应用于临床, 尤其是颅脑手术^[9]。近年来研究显示, 异氟醚可影响多种恶性肿瘤的发生发展, 但在不同恶

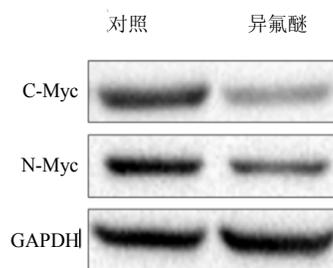


图 2 两组细胞 C-Myc 及 N-Myc 表达水平的比较

Fig. 2 Comparison of expression levels of C-Myc and N-Myc between two groups

性肿瘤中呈现出双重作用。异氟醚对恶性肿瘤进展存在促进作用: 异氟醚可上调基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1, Hif-1 α) 等原癌基因的表达, 促进舌癌^[10]、头颈部鳞状细胞癌^[3]、卵巢癌^[11]及前列腺癌细胞^[4]的侵袭转移及增殖能力。同时异氟醚也存在一定的抑癌作用: 异氟醚可通过 Akt/Bd 途径及下调 CD44 和 CD54 的表达, 分别促进人基底样型乳腺癌及非小细胞肺癌的凋亡^[12-13]。上述研究提示了异氟醚的双重生物学效应, 但其对于 HGG 细胞恶性行为的影响尚不明确。基于异氟醚在颅脑手术中的广泛应用, 其与 HGG 细胞恶性行为的关系对于临床用药指导就显得格外重要, 本研究通过体外实验手段对异氟醚与 HGG 细胞恶性行为的关系及相关机制进行了探究, 以期指导异氟醚在脑胶质瘤手术中的应用。

本研究发现 2%异氟醚处理 IV 级人脑胶质瘤细

胞 SHG-44 6 h 后, 细胞增殖、侵袭及迁移能力均显著降低, 提示异氟醚对 HGG 细胞恶性行为的抑制作用。进而对可能的相关机制进行了探究, C-Myc 在多种恶性肿瘤中表达上调, 并发挥重要的促癌作用^[14], 其同样可促进脑胶质瘤细胞增殖、转移及血管的生成, 导致脑胶质瘤患者病情的进展^[6, 15]; N-Myc 高表达于神经母细胞瘤中^[16], 近年有研究发现, N-Myc 对脑胶质瘤细胞的增殖存在显著的促进作用^[17]。本研究发现, 异氟醚处理后的 HGG 细胞 C-Myc、N-Myc 的表达均显著下调, 提示异氟醚可能通过抑制 C-Myc 及 N-Myc 的表达进而介导 HGG 细胞增殖转移能力的下降。

异氟醚可能通过下调 MYC 基因的表达抑制 HGG 的发生发展, 对 HGG 手术麻醉用药具有一定的指导意义, 我们将在进一步的动物模型实验中, 明确异氟醚在体内的生物学作用, 同时对异氟醚影响 MYC 基因表达的具体机制开展工作, 为揭示异氟醚在 HGG 手术中的潜在应用价值提供新的依据。

参考文献

- [1] 倪峰, 何晓军, 陆美芹, 等. 替莫唑胺联合放疗对脑肿瘤疗效的临床研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(11): 166-167.
- [2] 徐秋实. 125 例人脑胶质瘤病例预后因素的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [3] 杨欣, 高瞻, 任军, 等. 异氟醚对体外头颈部鳞状细胞癌细胞系增殖与凋亡的影响 [J]. 中华老年口腔医学杂志, 2012, 10(6): 332-336.
- [4] Huang H, Benzonana L L, Zhao H, et al. Prostate cancer cell malignancy via modulation of HIF-1 α pathway with isoflurane and propofol alone and in combination [J]. Br J Cancer, 2014, 111(7): 1338.
- [5] Beltran H. The N-myc oncogene: maximizing its targets, regulation, and therapeutic potential [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(6):815.
- [6] Rajagopalan V, Vaidyanathan M, Janardhanam V A, et al. Pre-clinical analysis of changes in intra-cellular biochemistry of glioblastoma multiforme (GBM) cells due to c-Myc silencing.[J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, 34(7):1059-69.
- [7] 邹海町. 七氟醚、异氟醚对骨肉瘤 MG63 细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [8] 魏敬松, 徐小方, 侯景利, 等. 异氟醚对人舌癌细胞基质金属蛋白酶-2 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(3): 317-319.
- [9] 卢成康. 异氟醚麻醉抑制海马齿状回神经干细胞的增殖及分化 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(19): 3049-3053.
- [10] 魏敬松, 徐小方, 侯景利, 等. 异氟醚对人舌癌细胞基质金属蛋白酶-2 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(3): 317-319.
- [11] Luo X, Zhao H, Hennah L, et al. Impact of isoflurane on malignant capability of ovarian cancer *in vitro* [J]. Br J Anaesth, 2015, 114(5): 831-839.
- [12] 冯娟, 吴满武. 异氟醚对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的影响及相关机制探讨 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(5): 8-11.
- [13] 梁桦, 杨承祥, 李恒, 等. 异氟醚和七氟醚对人肺癌细胞株 A549 细胞凋亡及 CD44 和 CD54 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(4): 389-391.
- [14] Dang C V. MYC on the path to cancer [J]. Cell, 2012, 149(1): 22-35.
- [15] Hu Y H, Kong S Q, Kong H B, et al. Targeting c-Myc on cell growth and vascular endothelial growth factor expression in IN500 glioblastoma cells [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(11): 2025-2031.
- [16] Beckers A, Van P G, Carter D R, et al. MYCN-targeting miRNAs are predominantly downregulated during MYCN - driven neuroblastoma tumor formation [J]. Oncotarget, 2015, 6(7): 5204-5216.
- [17] Sun G, Lu J, Zhang C, et al. MiR-29b inhibits the growth of glioma via MYCN dependent way [J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45224-45233.