

小白菊内酯通过靶向c-myc G-四链体抑制乳腺癌细胞增殖和迁移

王玉青, 高 玥, 韦 荣, 李 让, 黄佩敏, 黄春容, 张 超, 陶移文, 张建业*

(广州医科大学药学院, 广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, 附属第五医院, 广东 广州 511436)

摘要: 探讨小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 通过靶向c-myc基因G-四链体抑制乳腺癌细胞增殖和迁移。采用表面等离子共振法和荧光共振能量转移法研究小白菊内酯与G-四链体的结合能力和热稳定能力; RT-PCR和Western blot实验检测PTL对c-myc蛋白转录和表达水平的影响; MTT和细胞划痕实验检测PTL对MCF-7细胞增殖和迁移的影响。结果表明, PTL对c-myc G-四链体有较好的结合和稳定能力, 结合 K_D 为 $13.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 对乳腺癌细胞MCF-7作用24、48和72 h的半数抑制浓度分别为 21.3 、 14.5 和 $9.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 且PTL可以有效抑制MCF-7细胞的迁移。PTL通过靶向c-myc G-四链体抑制肿瘤细胞中c-myc基因的转录和表达, 进而抑制乳腺癌细胞增殖和迁移。

关键词: 小白菊内酯; G-四链体; 乳腺癌; 增殖; 迁移

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1622-05

Effect of parthenolide on proliferation and migration of MCF-7 breast cancer cells by targeting the c-myc G-quadruplex

WANG Yu-qing, GAO Yue, WEI Rong, LI Rang, HUANG Pei-min, HUANG Chun-rong,
ZHANG Chao, TAO Yi-wen, ZHANG Jian-ye*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Target and Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences and the Fifth Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: This research investigated the effect of parthenolide on the proliferation and migration of human breast cancer cells and explored the molecular mechanism of that effect. Surface plasmon resonance and fluorescence resonance energy transfer melting were used to detect the binding and stabilizing ability of PTL and G-quadruplex. MTT assays were used to determine the effect of PTL on the proliferation of MCF-7 breast cancer cells. A wound healing assay was performed to detect the migration of MCF-7. The results indicate that PTL shows good binding and stabilizing activities with c-myc G-quadruplex with a $K_D = 13.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. PTL inhibited the proliferation of MCF-7 cells with an IC_{50} of $21.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (24 h), $14.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (48 h) and $9.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (72 h). PTL inhibited MCF-7 breast cancer cell proliferation and migration and down-regulated the transcription and expression level of c-myc by targeting G-quadruplex.

Key words: parthenolide; G-quadruplex; breast cancer; proliferation; migration

乳腺癌已成为全球女性新发癌症中发病率最高的癌症, 2018年全球癌症数据显示女性乳腺癌的发病率

高达24.2%^[1]。据我国国家癌症中心数据显示, 中国乳腺癌发病率和死亡率总体呈上升趋势, 且逐渐向年轻人群发展^[2,3]。目前临床上对于乳腺癌的治疗方法多为手术治疗, 并结合化疗、放疗、靶向治疗和中药辅助治疗等多种方式。但随着治疗的推进, 现有药物和治疗方法会出现耐药和预后效果差的问题。因此, 利用我国丰富的中草药资源库寻找新型治疗药物, 一直都是治疗乳腺癌研究的热点。

收稿日期: 2020-05-08; 修回日期: 2020-06-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903467); 广州市科技计划项目 (202002030410); 广州医科大学2020年度大学生实验室开放项目 (PX-1020418); 广州医科大学2020-2021年度大学生科技创新项目 (2019A094).

*通讯作者 Tel: 86-20-37103631, E-mail: jianyez@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0738

小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是从艾菊、小白菊和观光木等药用植物中提取分离到的一种倍半萜内脂类化合物^[4], 具有抗炎、调节免疫、治疗头痛和风湿等功效^[5]。近年来发现, PTL 对多种实体瘤具有抗癌活性, 如乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌和宫颈癌等^[6-8]。研究表明, PTL 能够通过 NF- κ B 等通路阻滞细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡等过程。c-myc 是与多种恶性肿瘤发展相关的原癌基因之一, 在 c-myc 基因的 P1 启动子区域有一段特殊的序列, 它可以折叠形成 G-四链体结构^[9]。研究表明, 化学小分子可以通过结合并稳定此 G-四链体结构, 抑制原癌基因 c-myc 的转录和表达, 从而抑制肿瘤细胞的增殖^[10,11]。目前, 研究者对 PTL 影响 c-myc 基因的表达情况研究较少, 且很少报道 PTL 抑制肿瘤细胞增殖的分子靶标。

本文主要通过一系列实验表明, 小白菊内酯通过稳定原癌基因 c-myc G-四链体, 抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 并探讨了其可能的作用机制。

材料与方法

材料与试剂 PTL (纯度>98%), 南京春秋生物工程有限公司; 寡核苷酸和 DNA 引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; MTT, 广州威佳生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基, 杭州吉诺生物医药技术有限公司; psiCHECK2 质粒来自于中山大学黄志纾课题组; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技股份有限公司; c-myc 蛋白单克隆抗体 (rabbit)、 β -actin 蛋白单克隆抗体 (rabbit) 和辣根过氧化物酶标记抗 rabbit 二抗, Cell Signaling Technology 公司。

细胞株及细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基培养, 培养环境为 37 °C、含 5% 的二氧化碳的饱和湿度细胞培养箱。当细胞在培养皿中生长融合度达到 80% 后, 用胰蛋白酶溶液处理, 进行传代培养。

表面等离子体共振 (SPR) 检测 PTL 与 G-四链体的结合能力 参照文献^[12]方法, 将生物素标记的 c-myc G-四链体 DNA (biotin-pu22, DNA 序列见表 1) 标记在已经标记了链霉亲和素的芯片上, 将含有浓度为 0、0.63、1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTL 的缓冲液流过芯片, 持续 400 s, 待 PTL 与 DNA 结合后, 再用 SPR 缓冲液流过芯片, 持续 300 s。每两次测试之间用 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 溶液再生芯片。信号采集后, 用仪器自带软件拟合 PTL 与 DNA 的结合能力。

荧光共振能量转移 (FRET) 熔解实验检测 G-四链体的稳定能力 参照文献^[11,12]方法, 将荧光标记的

Table 1 Oligomer sequence and primer used in the experiment

Oligomer	Sequence (from 5' to 3')
Biotin-pu22	Biotin-TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA
F22T	FAM-TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA-TAMRA
β -actin-S	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
β -actin-A	AAGGGACTTCTGTAAACAACGCA
c-myc-S	GTGGCACCTCTTGAGGACCT
c-myc-A	TGGTGCTCCATGAGGAGAGCA

DNA F22T (DNA 序列见表 1) 用 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 95 °C 加热 10 min 后, 使体系缓慢降至室温。将 PTL 与退火后的 DNA 混合均匀后, PTL 的终浓度分别为 0 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DNA 的终浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 °C 孵育 12 h。将样品转移至 PCR 管, 使用实时荧光定量 PCR 仪进行实验, 实验过程中温度由 37 °C 逐渐升高至 95 °C, 每 1 min 升高 1 °C, 设置激发波长为 470 nm, 发射光谱检测 530 nm 处的荧光强度。实验结束后, 用 GraphPad Prism 5.0 作图并拟合 DNA 的熔解温度 T_m 值, 并计算 ΔT_m 值。

MTT 比色法检测 PTL 对细胞增殖的影响 将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 96 孔板中, 接种密度为每孔 4 000 个, 放置在 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 使细胞完全贴壁后, 弃去上清, 加入溶解有终浓度为 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PTL 细胞培养液, 于 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中分别培养 24、48 和 72 h。向每孔中加入 MTT (2.5 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶液 20 μL , 继续放入 37 °C 培养箱 4 h, 随后弃去上清, 加入 DMSO (每孔 100 μL), 用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值, 并用 GraphPad Prism 5.0 软件处理数据。PTL 对细胞增殖的抑制率 = $(1 - A_{\text{PTL组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

逆转录 PCR 实验 (RT-PCR) 检测相关基因的转录 将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度为 20 万/孔, 放置在 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 使细胞完全贴壁后, 加入溶解有终浓度为 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PTL 细胞培养液, 于 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 6 h。收集细胞样品, 用 RNA 小量提取试剂盒提取细胞 RNA, 按文献方法将 RNA 逆转录为 cDNA^[10], 将 cDNA 进行 PCR 反应, 引物序列见表 1 (β -actin-S、 β -actin-A、c-myc-S、c-myc-A), PCR 程序为: 94 °C 10 min; 94 °C 1 min, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min (30 个循环); 70 °C 10 min, 最后至 4 °C。再将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后拍照, 用 QuantityOne 软件对实验结果进行分析。

蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白的表达 将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度为 20 万/孔, 放置在 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培

养箱中培养 24 h 使细胞完全贴壁后, 加入溶解有终浓度为 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PTL 细胞培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 细胞培养箱中培养 48 h。随后收集细胞, 加入蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, 并使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度后, 制备蛋白样品。按文献^[11]方法将蛋白样品进行免疫印迹实验, 得到各蛋白的免疫印迹条带。以 β -actin 蛋白条带作为参照。

双荧光素酶报告基因法检测 PTL 对 c-myc G-四链体的影响 将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 96 孔板中, 接种密度为 5 000 个/孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 细胞培养箱中培养 24 h, 将含有 pGL-c-myc-WT 或 pGL-c-myc-MU 的双荧光素酶重组 psiCHECK2 质粒^[10]转染到细胞中。将 PTL 与转染后的细胞进行孵育培养 24 h 后, 洗涤细胞, 用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶表达的相对活性, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理。

划痕法检测细胞的迁移 将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 细胞培养箱中使细胞融合率达到 80% 后, 移液器吸头对培养板底部均匀划痕, 无血清培养液洗涤细胞。用无血清细胞培养液饥饿培养 24 h, 随后在 6 孔板中加入溶解有终浓度为 0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PTL 无血清细胞培养液, 继续放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 细胞培养箱中培养, 在培养 0、24、48 和 72 h 后, 用显微镜对划痕处拍照。

统计学分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每项实验至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 PTL 对 G-四链体 DNA 的结合能力

通过 SPR 实验测定不同浓度的 PTL 对 G-四链体 DNA 的结合情况, 结果表明 (图 1), PTL 对 c-myc G-四链体 DNA 的结合常数 K_D 为 13.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明 PTL 对 c-myc G-四链体有较好的结合能力。

2 PTL 对 G-四链体 DNA 的稳定能力

通过 FRET 熔解实验测定荧光标记的寡核苷酸 G-四链体序列 F22T 空白组和经过 PTL 稳定之后的 F22T,

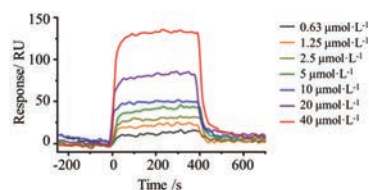


Figure 1 The binding ability of parthenolide (PTL) and c-myc G-quadruplex DNA by surface plasmon resonance

随着温度逐渐增加的熔解曲线。实验结果表明 (图 2), F22T 空白组 DNA 的解链温度 T_m 值为 69.2 $^{\circ}\text{C}$, PTL 稳定后的 F22T 解链 T_m 值为 74.3 $^{\circ}\text{C}$, 说明 PTL 对 c-myc G-四链体有一定的热力学稳定能力, ΔT_m 值为 5.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

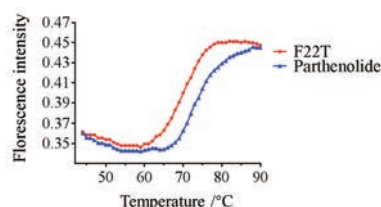


Figure 2 The melting curves of G-quadruplex by fluorescence resonance energy transfer melting assays

3 PTL 对乳腺癌细胞增殖水平的影响

与对照组相比, PTL 对体外培养的 MCF-7 细胞的增殖具有抑制作用, 且随着浓度的增加和作用时间的延长, 抑制作用越明显。MTT 实验结果表明, PTL 作用 24、48 和 72 h 后对 MCF-7 细胞增殖的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 21.3、14.5 和 9.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 见图 3。

4 PTL 对原癌基因 c-myc 转录和表达的影响

在对 MCF-7 细胞系进行的 RT-PCR 实验结果表明, 与空白对照组相比, c-myc 基因的转录水平随着 PTL 作用浓度的增加而降低, 见图 4A; Western blot 实验表明, 随着 PTL 作用浓度的增加, c-myc 蛋白的表达水平降低, 见图 4B。表明 PTL 可能是通过稳定原癌基因 c-myc 启动子区域的 G-四链体结构, 进而抑制 c-myc 基因的转录和表达的。

5 PTL 对 c-myc G-四链体的影响

双荧光素酶报告基因实验表明, 与空白对照组相

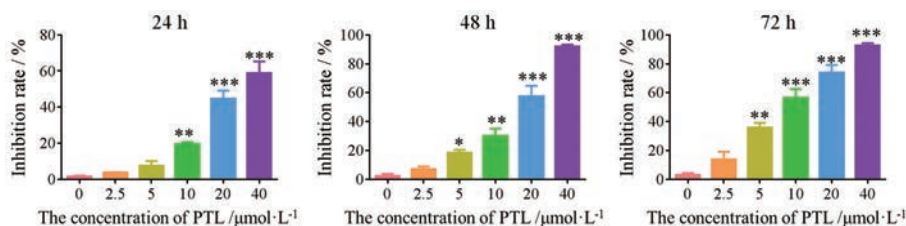


Figure 3 The inhibiting ability of PTL with different concentrations and time on breast cancer MCF-7 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

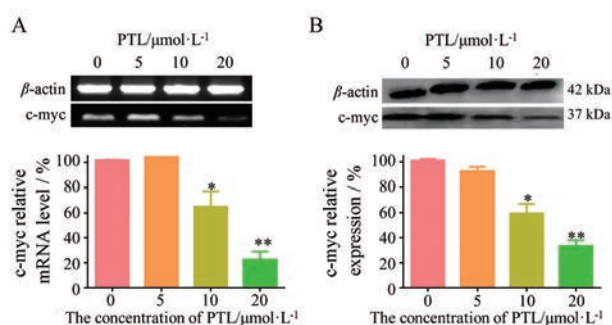


Figure 4 Effects of PTL on the *c-myc* transcription and expression in MCF-7 cells. A: The mRNA level of β -actin and *c-myc* in MCF-7 treated by PTL; B: The expression level of β -actin and *c-myc* in MCF-7 treated by PTL. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

比, 作用于 *c-myc* 启动子 G-四链体形成序列的 pGL-c-myc-WT 重组质粒后, PTL 使萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的荧光比值降低; 而作用于 G-四链体形成序列的突变序列 pGL-c-myc-MU 重组质粒后, 对照组与 PTL 组荧光比值基本不变, 见图 5。以上结果说明, PTL 是通过作用于 *c-myc* 启动子的 G-四链体结构产生生物活性的。

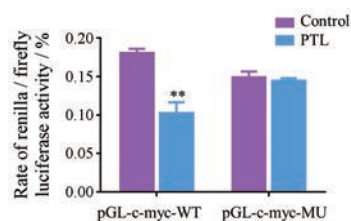


Figure 5 Effects of PTL on *c-myc* promoter G-quadruplex via dual luciferase reporter assays. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

6 PTL 对乳腺癌细胞迁移的影响

在细胞划痕实验中, 空白对照组和 PTL 处理组, 分别在 0、24、48 和 72 h 拍照记录划痕大小, 并观察细胞迁移情况。实验结果如图 6 所示, 空白对照组 MCF-7 细胞随着时间的延长, 因为细胞迁移, 划痕逐渐愈合, 在 72 h 后划痕基本愈合消失。10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PTL 作用于 MCF-7 细胞后, 划痕的愈合速度减慢, 在 72 h 后仍有较大划痕没有愈合, 说明 PTL 有效地抑制了 MCF-7 细胞的迁移。

讨论

乳腺癌作为危害全世界女性健康的恶性肿瘤之一, 尽管人们采取了多种治疗手段, 其死亡率依然居高不下, 如何提高乳腺癌治疗的临床疗效是亟需解决的

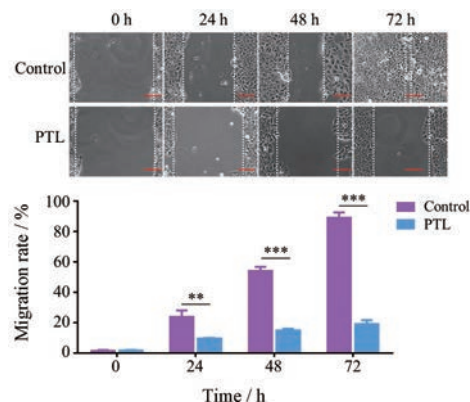


Figure 6 The migration of MCF-7 cells after treated by PTL 24, 48 or 72 h. Scale bar: 100 μm . $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

重要课题。目前常用的治疗手段是手术治疗和化疗, 它能够在一定程度延长患者的生存期, 但预后较差, 总体治疗效果一般^[1]。近年来人们不断尝试乳腺癌治疗的研究^[13,14], 但化学靶向药物的毒副作用较大, 纳米药物应用程度差强人意。我国中草药资源丰富, 在对肿瘤的治疗中已发现, 中草药中富含的独特的化合物骨架是多种抗肿瘤先导化合物的来源, 如雷公藤甲素和厚朴酚等^[15,16]。PTL 作为天然产物来源的活性小分子, 在对肿瘤有较好的抑制作用的同时, 其对人体正常细胞的毒副作用较弱, 具有较好的发展潜力。

c-myc 基因是 *myc* 基因家族的重要成员之一, 它所编码的蛋白质称为 *c-myc* 蛋白, 主要参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、生存、黏附以及细胞大小等多种重要的细胞生物学功能。研究表明, *c-myc* 的转录活化作用主要通过促进细胞周期, 刺激细胞生长和代谢, 在组织修复重建和肿瘤的发生发展中起到关键性作用^[17,18]。多个研究报道表明, 通过稳定 *c-myc* 基因启动子区域的 G-四链体结构, 可以抑制 *c-myc* 基因的转录和表达, 是抑制癌细胞增殖的有效手段^[10,19,20]。

多种研究表明, 肿瘤的迁移和转移与原癌基因 *c-myc* 密切相关。*c-myc* 在移植瘤模型中可以促进乳腺癌细胞发生脑转移^[21]。表观遗传调控基因 *JMJD6* 可以与 *c-myc* 基因协同作用, 诱导肿瘤的发生、增强肿瘤的转化和转移^[22]。细胞转移的调节因子 *LPCAT1* 通过靶向 *c-myc* 基因转录, 上调 *PI3K/AKT/myc* 信号通路, 促进了肺腺癌的脑转移^[23]。转录阳性辅助因子 4 (*PC4*) 通过 *c-myc* 介导的 Warburg 效应促进了乳腺癌的增殖和转移^[24]。氧化低密度脂蛋白受体 1 (*OLR1*) 通过诱导 *c-myc* 基因表达和 *HMGA2* 转录, 增强胰腺癌细胞迁移^[25]。由此说明, 通过特定的方法影响 *c-myc* 基因的转录表达, 可以影响肿瘤细胞的转移。

综上所述, PTL 能通过结合并稳定 *c-myc* 基因启动子区域的 G-四链体结构, 影响原癌基因 *c-myc* 的转录和表达水平, 进而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞系的增殖和迁移水平。此研究结果为 PTL 发展为一个新型的靶向 G-四链体的抗乳腺癌药物, 提供了新的实验依据。关于 PTL 抑制乳腺癌细胞增殖的 *c-myc* 下游信号通路有待进一步的研究与探讨。

作者贡献: 王玉青: 负责提出研究思路, 设计研究方案, 进行实验, 撰写文章初稿; 高玥、韦荣、李让: 负责进行实验; 黄佩敏、黄春容: 负责采集和数据分析; 张超、陶移文: 负责论文初稿修改; 张建业: 负责论文初稿修改和最终版本修订。

利益冲突: 本论文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] Chen W, Sun K, Zhang R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30: 1-12.
- [3] Chen WQ, Zheng RS, Baade P, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [4] Aleksander O, Grażyna A, Anna WP. Air-borne dermatitis from *Chrysanthemum*-case report with a discussion of diagnostic procedures and therapy [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2014, 21: 531-533.
- [5] Tsai TY, Chan P, Gong CL, et al. Parthenolide-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblasts involves oxidative stress [J]. *Acta Cardiol Sin*, 2015, 31: 33-41.
- [6] Li X, Kong L, Yang Q, et al. Parthenolide inhibits ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7), Wnt signaling, and colorectal cancer cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 3576-3589.
- [7] Freund RRA, Gobrecht P, Fischer D, et al. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37: 541-565.
- [8] Lin M, Bi H, Yan Y, et al. Parthenolide suppresses non-small cell lung cancer GLC-82 cells growth *via* B-Raf/MAPK/Erk pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 23436-23447.
- [9] Brooks TA, Kendrick S, Hurley L. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters [J]. *FEBS J*, 2010, 277: 3459-3469.
- [10] Zeng DY, Kuang GT, Wang SK, et al. Discovery of novel 11-triazole substituted benzofuro[3, 2-b]quinolone derivatives as *c-myc* G-quadruplex specific stabilizers *via* click chemistry [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5407-5423.
- [11] Shan C, Yan JW, Wang YQ, et al. Design, synthesis, and evaluation of isaindigotone derivatives to downregulate *c-myc* transcription *via* disrupting the interaction of NM23-H2 with G-quadruplex [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1292-1308.
- [12] Guo QL, Su HF, Wang N, et al. Synthesis and evaluation of 7-substituted-5, 6-dihydrobenzo[c]acridine derivatives as new *c-KIT* promoter G-quadruplex binding ligands [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 130: 458-471.
- [13] Mei D, Chen BL, He B, et al. Actively priming autophagic cell death with novel transferrin receptor-targeted nanomedicine for synergistic chemotherapy against breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 1061-1077.
- [14] Pallabita C, Prashanth KBN, Sheema K, et al. Development of polyvinylpyrrolidone/paclitaxel self-assemblies for breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 602-614.
- [15] Dai X, Li RZ, Jiang ZB, et al. Honokiol inhibits proliferation, invasion and induces apoptosis through targeting lyn kinase in human lung adenocarcinoma cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 558.
- [16] Feng JJ, Rao MJ, Wang M, et al. Triptolide suppresses pancreatic cancer cell proliferation by inhibiting hedgehog signaling pathway activity [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1409-1412.
- [17] Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with Myc [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 976-990.
- [18] Soucek L, Whitfield J, Martins CP, et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy [J]. *Nature*, 2008, 455: 679.
- [19] Hu MH, Wang YQ, Yu ZY, et al. Discovery of a new four-leaf clover-like ligand as a potent *c-Myc* transcription inhibitor specifically targeting the promoter G-quadruplex [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 2447-2459.
- [20] Wang YQ, Huang ZL, Chen SB, et al. Design, synthesis, and evaluation of new selective NM23-H2 binders as *c-Myc* transcription inhibitors *via* disruption of the NM23-H2/G-quadruplex interaction [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 6924-6941.
- [21] Lee HY, Cha J, Kim SK, et al. *c-MYC* drives breast cancer metastasis to the brain, but promotes synthetic lethality with TRAIL [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17: 544-554.
- [22] Aprelikova O, Chen K, Touny LHE, et al. The epigenetic modifier JMJD6 is amplified in mammary tumors and cooperates with *c-Myc* to enhance cellular transformation, tumor progression, and metastasis [J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 38.
- [23] Wei C, Dong X, Lu H, et al. LPCAT1 promotes brain metastasis of lung adenocarcinoma by up-regulating PI3K/AKT/Myc pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 95.
- [24] Luo P, Zhang C, Liao F, et al. Transcriptional positive cofactor 4 promotes breast cancer proliferation and metastasis through *c-Myc* mediated Warburg effect [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17: 36.
- [25] Yang G, Xiong GB, Feng MY, et al. OLR1 promotes pancreatic cancer metastasis *via* increased *c-Myc* expression and transcription of HMGA2 [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18: 685-697.