DOI:10.16016/j.1000-5404.202106070

腺苷脱氨酶1在肺腺癌组织中的表达及临床意义

杨文娣,余 钱,郭政军,张晓月,彭 媛,杨镇洲 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤中心

[摘要] **目的** 探讨RNA特异性腺苷脱氨酶1(adenosine deaminase acting on RNA-1,ADAR1)在肺腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的相关性。**方法** 通过免疫组织化学染色法检测2015年12月至2017年9月本院收治的131例肺腺癌患者术后组织标本以及相应癌旁组织中ADAR1的表达,分析ADAR1蛋白的表达与患者临床病理参数的关系,并利用Kaplan-Meier法分析ADAR1表达水平和患者总生存期(overall survival,OS)的关系,拟合Cox模型评价不同指标的预后价值。**结果** 肺腺癌组织中ADAR1蛋白表达量为77.9%,显著高于相应配对的癌旁组织(12.5%,$P<0.01$),且ADAR1表达与患者临床分期和淋巴结转移有关($P<0.05$),Kaplan-Meier分析表明ADAR1高表达与较短的OS显著相关($HR=2.671$,95%CI:1.282~5.563, $P<0.01$);多因素Cox回归分析显示,临床分期和淋巴结转移($P<0.01$)可作为肺腺癌患者预后评估的独立危险因素。**结论** ADAR1在肺腺癌组织中高表达,且肺腺癌患者中ADAR1高表达提示预后不良。

[关键词] RNA特异性腺苷脱氨酶1;肺腺癌;临床分期;预后
[中图法分类号] R345; R730.43; R734.2 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of adenosine deaminase acting on RNA-1 in lung adenocarcinoma

YANG Wendi, YU Qian, GUO Zhengjun, ZHANG Xiaoyue, PENG Yuan, YANG Zhenzhou Cancer Center, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) in lung adenocarcinoma and its association with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detect the expression of ADAR1 in the tumor tissues and corresponding adjacent normal tissues of 131 patients with lung adenocarcinoma treated in our hospital from December 2015 to September 2017. The association between the expression of ADAR1 protein and clinicopathological parameters was analyzed. Kaplan-Meier analysis was performed to analyze the correlation between ADAR1 level and patients' overall survival (OS), and fitting Cox model was used to evaluate the prognostic values of different indixes. **Results** ADAR1 was highly expressed in 102 cases (77.9%) of the patients, while only 21 cases (12.5%) of paired para-carcinoma tissues, indicating a significant difference ($P<0.001$), and the level of ADAR1 was correlated with clinical stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that higher expression of ADAR1 was remarkably associated with shorter OS ($HR=2.671$, 95%CI: 1.282~5.563, $P<0.01$). Multivariate Cox regression analysis suggested that clinical stage and lymph node metastasis ($P<0.01$) were independent risk factors for prognosis of the patients. **Conclusion** ADAR1 is highly expressed in lung adenocarcinoma tissues, and the patients with higher expression indicate poorer prognosis.

[基金项目] 重庆医科大学附属第二医院"宽仁英才"项目(202007),重庆市自然科学基金博士后科学基金(cstc2019jcyj-bshX0056)
[通信作者] 杨镇洲,E-mail: yangzz@cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议( )

[**Key words**] adenosine deaminase acting on RNA-1; lung adenocarcinoma; clinical stages; prognosis

Supported by the "Kuanren Talents" Program of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (202007), and the Postdoctoral Program of Natural Science Foundation of Chongqing(cstc2019jcyj-bshX0056). Corresponding author: YANG Zhenzhou, E-mail: yangzz@cqmu.edu.cn

肺癌是全球发病率第二高的恶性肿瘤,是癌症死亡的主要原因[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)约占所有肺癌的85%,其中肺腺癌是NSCLC最常见的组织学亚型,且大多数患者发现时已处于晚期,五年生存率较低[2-3]。因此,深入阐明肺腺癌的发生发展机制,寻找更多关键的治疗靶点,对临床诊疗及改善患者预后具有十分重要的意义。RNA编辑是一种重要的基因转录后修饰方式,癌症的发生发展与异常的基因表达调控密切相关[4]。RNA特异性腺苷脱氨酶1(adenosine deaminase acting on RNA-1,ADAR1)是一种作用于双链核糖核苷酸(double-stranded RNA,dsRNA)使腺苷脱氨基产生肌苷(adenosine-to-inosine,A-to-I),最后导致蛋白质中氨基酸改变的RNA编辑酶[5]。研究表明,ADAR1能通过诱导抗酶抑制因子1(antizyme inhibitor 1,AZIN1)过表达促进NSCLC的恶性进展[6],其表达水平变化还与黑色素瘤[7]、食管鳞状细胞癌[8]、乳腺癌[9]、宫颈癌[10]和多发性骨髓瘤[11]等癌症的发生发展密切相关,且ADAR1在肿瘤中过表达可使肿瘤细胞逃避免疫识别[12]。然而,肺腺癌组织中ADAR1的表达及其与患者临床病理特征的国内相关性研究鲜有报道。因此,本研究采用免疫组织化学染色法,检测肺腺癌患者组织中ADAR1的表达水平,分析其与临床病理特征及预后的关系,旨在为肺腺癌的诊断和治疗提供一定的思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象及临床资料

收集2015年12月至2017年9月于本院行肺切除术的131例肺腺癌患者组织标本,包括癌组织和癌旁组织(距离病灶约2 cm、部分采用免疫组化ABC法染色,光镜下呈现阳性反应)。切除标本HE染色后由资深病理科医师进行诊断。部分组织制作成2个组织芯片蜡块。

1.2 免疫组织化学方法检测肺腺癌组织中ADAR1蛋白表达水平

1.2.1 免疫组化染色 用PBS将肺腺癌组织和癌旁组织洗净,室温下于4%多聚甲醛中过夜固定,脱水后用石蜡包埋以得到4 μm石蜡切片。使用S-P免疫组化试剂盒(S-P9001,中杉金桥),根据使用说明进行免疫组化染色。首先将切片用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,3% H_2O_2 封闭10 min,10 mmol/L枸橼酸钠中微波加热15 min进行抗原修复。然后,4 ℃条件下将切片与兔抗ADAR1多克隆抗体(1∶400,货号:81284,Cell Signaling Technology)过夜结合。随后室温下用结合辣根过氧化物酶的二抗与切片反应30 min,并用DAB显色试剂盒(ZLI-9017,中杉金桥)显色。最后用苏木精染料(ZLI-9610,中杉金桥)进行复染以及用中性树脂(G8590,Solarbio)封片。

1.2.2 染色结果判定 由两位经验丰富的病理学专家行双盲免疫组化结果评分(immunoreaction score,IRS)。包括细胞染色强度评分(0分:无细胞染色,1分:浅棕色颗粒,2分:棕黄色颗粒,3分:棕褐色颗粒)以及阳性细胞所占比例评分(0分:≤5%,1分:>5%~25%,2分:>25%~50%,3分:>50%~75%,4分:>75%)。最终结果为两项评分的乘积,0~7分为低表达,8~12分为高表达。

1.3 统计学处理

使用SPSS 15.0对数据进行统计分析,用Image J(National Institutes of Health)分析免疫组织化学染色结果。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,单因素分析采用 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier法,拟合Cox回归分析模型。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

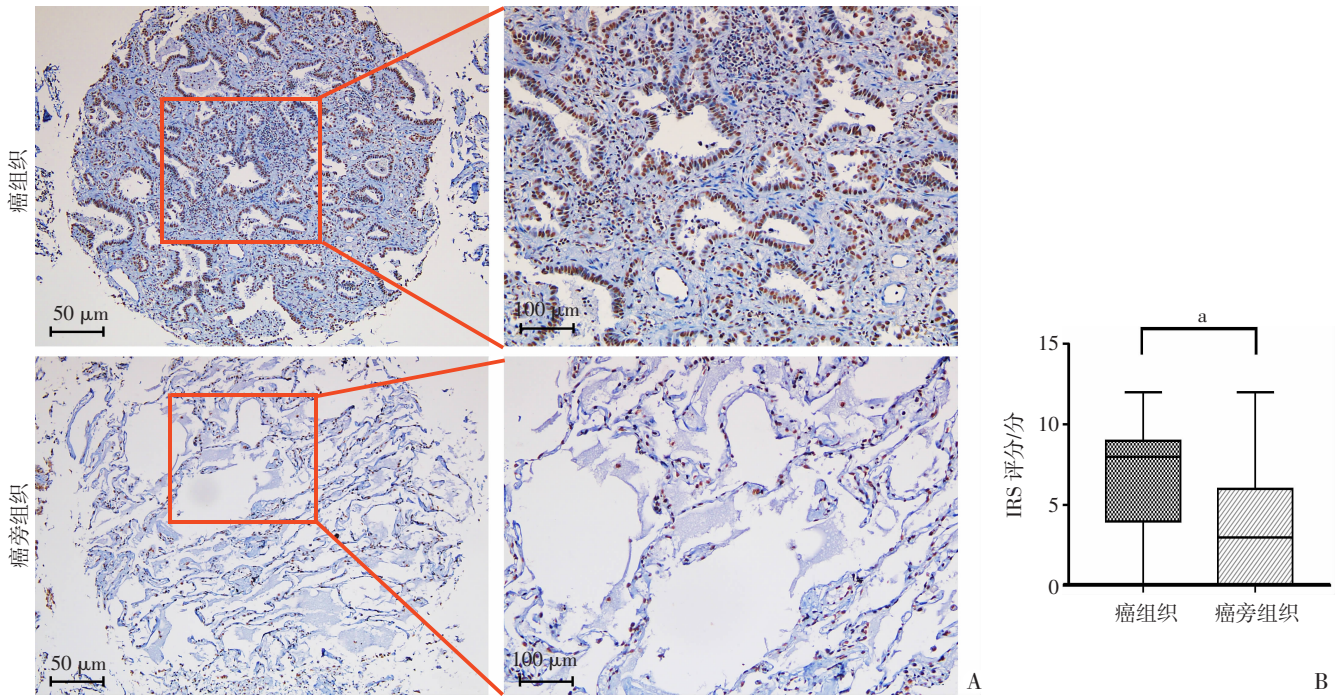
2 结果

2.1 ADAR1在肺腺癌及癌旁组织中的表达

利用免疫组织化学染色检测131例配对的肺腺癌组织和癌旁组织中ADAR1蛋白表达情况。结果表明,ADAR1蛋白阳性染色主要定位于细胞核,阳性表达呈棕黄色或棕褐色颗粒(图1A)。肺腺癌组织中ADAR1高表达共102例(77.9%),而癌旁组织中仅21例(16.0%),两者差异有统计学意义($P<0.001$,图1B)。

2.2 ADAR1蛋白表达与患者临床病理参数的关系

进一步分析ADAR1表达与患者临床病理资料发现,肺腺癌组织中ADAR1蛋白表达与临床分期($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.05$)呈正相关,即其表达水平愈高,肺腺癌临床分期愈晚,更易发生淋巴结转移;与患者年龄、性别等其他临床病理特征无显著相关性($P>0.05$,表1)。



A:免疫组化观察 ADAR1 表达;B:免疫组化染色 IRS 评分 a:$P<0.001$

图 1 ADAR1 在肺腺癌组织和癌旁组织中表达

表 1 肺腺癌组织中 ADAR1 表达与临床病理特征的关系[例(%)]

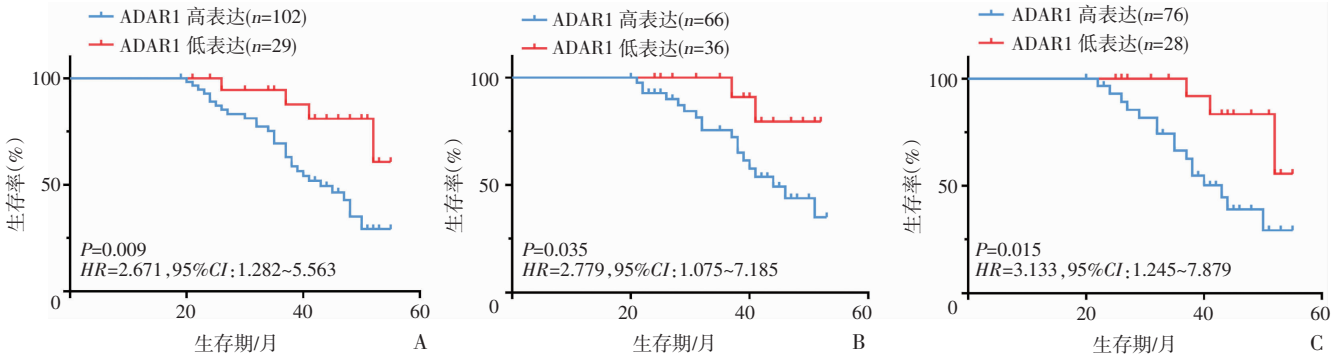
临床病理特征	n	高表达	低表达	P
年龄(岁)				0.834
<63	61	47(77.0)	14(23.0)	
≥63	70	55(78.6)	15(21.4)	
性别				0.195
男	59	49(83.0)	10(17.0)	
女	72	53(73.6)	19(26.4)	
淋巴结转移				0.01
无转移	92	66(71.7)	26(28.3)	
有转移	39	36(92.3)	3(7.7)	
T 分期				0.259
T1	64	46(71.9)	18(28.1)	
T2	43	35(81.4)	8(18.6)	
T3	16	13(81.2)	3(18.8)	
T4	8	8(100.0)	0(0.0)	
N 分期				0.506
N0	92	72(78.3)	20(21.7)	
N1	29	21(72.4)	8(27.6)	
N2	10	9(90.0)	1(10.0)	
M 分期				0.065
M0	120	91(75.8)	29(24.2)	
M1	11	11(100.0)	0(0.0)	
临床分期				0.014
Ⅰ期	63	42(66.7)	21(33.3)	
Ⅱ期	41	34(82.9)	7(17.1)	
Ⅲ期	16	15(93.8)	1(6.2)	
Ⅳ期	11	11(100.0)	0(0.0)	

2.3 ADAR1 蛋白的表达与肺腺癌患者总生存期的关系

为了明确 ADAR1 表达与患者预后的关系,采用 Kaplan-Meier 法分析 131 例肺腺癌患者 ADAR1 表达与总生存期(overall survival,OS)的关系。结果显示 ADAR1 高表达患者 OS 显著低于 ADAR1 低表达患者($HR=2.671$,95%CI:1.282~5.563;$P<0.01$;图 2)。在有淋巴结转移和临床分期Ⅲ、Ⅳ期的肿瘤患者中 ADAR1 高表达组和低表达组的生存曲线分布差异无统计学意义($P>0.05$),而在无淋巴结转移和临床分期Ⅰ、Ⅱ期的患者中 ADAR1 高表达组与低表达组的生存曲线分布差异有统计学意义($P=0.035$、$P=0.015$),表现为 ADAR1 高表达组的生存状况差于 ADAR1 低表达组患者。表明在无淋巴结转移和临床分期Ⅰ、Ⅱ期的肿瘤患者中 ADAR1 高表达更具有作为预后不良指标的意义(图 2)。

2.4 ADAR1 蛋白表达作为临床诊断和预后指标的多因素分析

结合免疫组化结果,单因素 Cox 模型分析显示,肺癌患者的临床分期、ADAR1 的表达和有无淋巴结转移均与肺腺癌患者的 OS 率显著相关;Cox 多因素回归分析结果亦显示,淋巴结转移和临床分期是肺腺癌患者预后的危险因素,此结果说明淋巴结转移与临床分期可作为肺腺癌患者预后评估的独立危险因素(表 2)。



A: ADAR1 表达对全部患者 OS 的影响;B: 对无淋巴结转移患者 OS 的影响;C: 对临床分期Ⅰ期和Ⅱ期患者 OS 的影响

图 2 ADAR1 表达与患者生存曲线

表 2 肺腺癌患者 OS 影响因素 Cox 回归分析

临床参数	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%*CI*)	*P*	*HR*(95%*CI*)	*P*
淋巴结转移	4.958(2.507~9.804)	<0.001	4.746(1.596~14.116)	0.005
临床分期	3.939(2.275~6.818)	<0.001	3.218(1.502~6.896)	0.003
ADAR1 表达	8.901(1.216~65.157)	0.031	2.081(0.248~17.469)	0.500

3 讨论

肺癌是癌症患者死亡的首要因素,具有高发病率和病死率,每年全球因肺癌死亡的患者约占所有癌症死亡患者总数的 18%,居癌症年均死亡率之首[1]。这是由于肺癌早期患者往往没有症状,且确诊时常处于进展阶段。目前国内外与肺癌有关的基础研究一直是肿瘤研究的热点,但其发生发展机制尚不清楚。尽管早期筛查方法和检查手段不断革新,但肺癌仍表现出临床病程短和病死率高的特点。因此,快速寻求肺癌的敏感诊断指标和预后标志物具有重要的临床意义。

ADAR1 是一种重要的 RNA 编辑酶,可催化 RNA 上腺嘌呤向次黄嘌呤转化(A-I),并将次黄嘌呤与胞嘧啶进行配对,最后改变蛋白质中的氨基酸[13]。ADAR1 主要功能是编辑内源的 dsRNA 和识别病毒的 dsRNA[14]。同时 ADAR1 也在其他生物过程中以非 RNA 编辑的形式发挥作用,比如通过 ADAR1 的 dsRNA 结合区域,参与蛋白质-蛋白质相互作用[15],从而调节各种免疫反应。研究表明,ADAR1 介导的 RNA 编辑模式和活性在肿瘤组织与正常组织中有所不同[16-17]。

本研究通过组织芯片技术和免疫组化技术检测 131 例肺腺癌患者癌组织及癌旁组织中 ADAR1 的表达,结合临床数据分析发现,癌组织中 ADAR1 表达的上调与临床分期、淋巴结转移、生存预后相关(表 1、图 2),并且在肺腺癌临床分期Ⅰ、Ⅱ期和无淋巴结转移的肿瘤患者中 ADAR1 高表达更具有作为独立不良预后指标的意义(图 2)。这种预后差异的出现可能与 ADAR1 的表达和临床分期的相关性有关。Cox 回归分析显示,肺腺癌患者的淋巴结转移情况和临床分期可共同作为临床预后指标。近年来有研究发现 ADAR1 可通过提高黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)mRNA 的稳定性从而促进肺腺癌的侵袭和迁移,并且 ADAR1 在肺腺癌中的蛋白表达水平与患者预后密切相关[18],与本研究结果具有一致性。这些结果提示 ADAR1 可能在肺腺癌的发生发展过程中起重要作用,为深入研究肺腺癌的不良预后标志物以及靶向治疗提供了新的思路和靶点。但本研究尚存在一定的局限性,未来可通过生物信息学分析,利用 TCGA 肺腺癌数据库等验证肺腺癌组织中 ADAR1 mRNA 及蛋白表达水平;同时,使用肺腺癌细胞系进行体外实验结合动物实验以深入研究 ADAR1 在肺腺癌发生发展过程中的具体作用及其相关机制,为肺腺癌的临床治疗和不良结局预防开辟新途径。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mor-

tality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] CHEN Z, FILLMORE C M, HAMMERMAN P S, *et al*. Non-small-cell lung cancers: a heterogenyeous set of diseases[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(8): 535-546. DOI: 10.1038/nrc3775.

[3] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385. DOI: 10.3322/caac.21565.

[4] GALEANO F, TOMASELLI S, LOCATELLI F, *et al*. A-to-I RNA editing: The "ADAR" side of human cancer[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(3): 244-250. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.09.003.

[5] ZHANG Y, QIAN H Z, XU J, *et al*. ADAR, the carcinogenesis mechanisms of ADAR and related clinical applications[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(22): 686. DOI: 10.21037/atm.2019.11.06.

[6] HU X, CHEN J, SHI X, *et al*. RNA editing of $AZIN_1$ induces the malignant progression of non-small-cell lung cancers[J]. Tumour Biol, 2017, 39(8): 1010428317700001. DOI: 10.1177/1010428317700001.

[7] SHOSHAN E, MOBLEY A K, BRAEUER R R, *et al*. Reduced adenosine-to-inosine miR-455-5p editing promotes melanoma growth and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(3): 311-321. DOI: 10.1038/ncb3110.

[8] QIN Y R, QIAO J J, CHAN T H, *et al*. Adenosine-to-inosine RNA editing mediated by ADARs in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2014, 74(3): 840-851. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2545.

[9] NAKANO M, FUKAMI T, GOTOH S, *et al*. A-to-I RNA editing up-regulates human dihydrofolate reductase in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2017, 292(12): 4873-4884. DOI: 10.1074/jbc.m117.775684.

[10] CHEN W, HE W, CAI H, *et al*. A-to-I RNA editing of BLCAP lost the inhibition to STAT3 activation in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39417-39429. DOI: 10.18632/oncotarget.17034.

[11] TEOH P J, AN O, CHUNG T H, *et al*. Aberrant hyperediting of the myeloma transcriptome by ADAR1 confers oncogenicity and is a marker of poor prognosis[J]. Blood, 2018, 132(12): 1304-1317. DOI: 10.1182/blood-2018-02-832576.

[12] FRITZELL K, XU L D, LAGERGREN J, *et al*. ADARs and editing: The role of A-to-I RNA modification in cancer progression[J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 79: 123-130. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.11.018.

[13] EISENBERG E. Proteome diversification by RNA editing[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2181: 229-251. DOI: 10.1007/978-1-0716-0787-9_14.

[14] LIDDICOAT B J, PISKOL R, CHALK A M, *et al*. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself[J]. Science, 2015, 349(6252): 1115-1120. DOI: 10.1126/science.aac7049.

[15] NEMLICH Y, BARUCH E N, BESSER M J, *et al*. ADAR1-mediated regulation of melanoma invasion[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2154. DOI: 10.1038/s41467-018-04600-2.

[16] SAMUEL C E. Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR1), a suppressor of double-stranded RNA-triggered innate immune responses[J]. J Biol Chem, 2019, 294(5): 1710-1720. DOI: 10.1074/jbc.tm118.004166.

[17] PAZ N, LEVANON E Y, AMARIGLIO N, *et al*. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer[J]. Genome Res, 2007, 17(11): 1586-1595. DOI: 10.1101/gr.6493107.

[18] AMIN E M, LIU Y, DENG S, *et al*. The RNA-editing enzyme ADAR promotes lung adenocarcinoma migration and invasion by stabilizingFAK[J]. Sci Signal, 2017, 10(497): eaah3941. DOI: 10.1126/scisignal.aah3941.

(收稿:2021-06-08;修回:2021-07-03)

(编辑 汪勤俭)