肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001164

8-氯腺苷调节 RNA 编辑酶 ADAR1 对乳腺癌 SK-BR-3细胞增殖和迁移的影响

谢　凤，莫小梅，杨生永，李　梨
（重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究 8-氯腺苷（8-chloro-adenosine，8-Cl-Ado）对乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖和迁移的影响，以及与 RNA 编辑酶 1（adenosine deaminases acting on RNA 1，ADAR1）表达的相关性。**方法**：蛋白印迹实验检测乳腺癌组织中 ADAR1 的蛋白表达量以及 8-Cl-Ado（10 μmol/L）处理乳腺癌 SK-BR-3 细胞不同时间 ADAR1 蛋白表达量的变化；MTT 法和形态学观察检测不加药组和 8-Cl-Ado（10 μmol/L）加药组对 SK-BR-3 细胞增殖的影响；MTT 法和伤口愈合实验检测 SK-BR-3 细胞过表达 ADAR1 质粒（空白对照组、空载组、ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组）对 8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞增殖及迁移的影响。**结果**：乳腺癌癌组织中 ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 蛋白表达量均明显高于癌旁组织（t=9.871，P=0.000；t=7.169，P=0.000）；8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞 48 h 后 ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 蛋白表达量均明显降低（t=-8.838，P=0.013；t=-19.866，P=0.003）；8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞 ADAR1-P110 组和 ADAR1-P150 组 48 h 后增殖抑制率均明显低于空白组（P 均为 0.000）；8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞 ADAR1-P110 组和 ADAR1-P150 组 48 h 后的迁移率均明显高于空白组（P 均为 0.000）。**结论**：8-Cl-Ado 能明显抑制 SK-BR-3 细胞增殖和迁移，其作用机制可能与 ADAR1 的表达下调有关。

【关键词】8-氯腺苷；乳腺癌；SK-BR-3；RNA 编辑酶；ADAR1
【中图分类号】R979.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-05

Effects of 8-chloro-adenosine regulating RNA editing deaminase ADAR1 on proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells

Xie Feng, Mo Xiaomei, Yang Shengyong, Li Li
(*Molecular Medicine and Tumor Research Center of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To evaluate the effects of 8-chloro-adenosine (8-Cl-Ado) on proliferation, migration and adenosine deaminases acting on RNA 1 (ADAR1) expression of SK-BR-3 breast cancer cells. ***Methods***: The expression of ADAR1 protein in breast cancer tissues and SK-BR-3 cells treated by 8-Cl-Ado (10 μmol/L) at different time were evaluated by Western blot. The effects of 8-Cl-Ado (10 μmol/L) on proliferation of SK-BR-3 at different time were detected by MTT and morphology observation. The effects of ADAR1 plasmid over-expression on proliferation and cell metastasis in SK-BR-3 cells (the blank group, the vector group, the ADAR1-P110 group, the ADAR1-P150 group) were tested by MTT and wound healing assay. ***Results***: The expressions of ADAR1-P110 and ADAR1-P150 protein in breast cancer tissues were significantly higher than those in adiacent tissues (t=9.871, P=0.000; t=7.169, P=0.000) and decreased obviously in SK-BR-3 cells treated by 8-Cl-Ado after 48 hours (t=-8.838, P=0.013; t=-19.866, P=0.003). The proliferation inhibition rates of SK-BR-3 cells treated by 8-Cl-Ado after 48 hours in the ADAR1-P110 group and the ADAR1-P150 group were lower than those in the control group (All P=0.000). Furthermore, the migration rates of SK-BR-3 cells treated by 8-Cl-Ado after 48 h in the ADAR1-P110 group and the ADAR1-P150 group were higher than those in the control group (All P<0.000). ***Conclusion***: 8-Cl-Ado could inhibit the proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells by the down-regulation of the expression of ADAR1 protein, the mechanism of action may be related to the down-regulation of ADAR1 protein ex pression.

【Key words】8-chloro-adenosine; breast cancer; SK-BR-3; RNA editing deaminase; ADAR1

作者介绍：谢　凤，Email：1244998951@qq.com，
研究方向：抗肿瘤药物的分子机制。
通信作者：李　梨，Email：lili_cq@aliyun.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170104.1013.018.html
（2017-01-14）

8-氯腺苷(8-chloro-adenosine,8-Cl-Ado)是新合成的腺苷类似物抗肿瘤药，现已经进入Ⅱ期临床，具有抑制多种肿瘤细胞增殖，诱导多种肿瘤细胞凋亡等作用[1-4]，但 8-Cl-Ado 的抗肿瘤作用机制尚未明确，其作用靶点可能是多靶位的。已有研究表明，RNA 编辑与多种恶性肿瘤的发生发展有关[5-11]。RNA 编辑酶 1(adenosine deaminases acting on RNA 1,ADAR1)是研究最为广泛的一种 RNA 编辑酶，有 P110 和 P150 两个亚型，P110 主要存在于细胞核中，而 P150 主要存在于细胞质中。ADAR1 能够将特殊位点上的腺苷去氨基转变为次黄嘌呤，即 A-to-I RNA 编辑，这是一种重要的转录后修饰方式。目前尚未发现 8-Cl-Ado 抗肿瘤作用有关的 RNA 编辑酶水平变化的研究报道。因此，本研究旨在探讨 8-Cl-Ado 对乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞增殖的影响以及与 ADAR1 表达的相关性，以初步阐明 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌细胞增殖的作用机制，寻找 8-Cl-Ado 抗肿瘤作用的新靶点，为以后深入研究 8-Cl-Ado 治疗乳腺癌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织、细胞、菌株及质粒 本课题使用的人乳腺癌组织及癌旁组织样本取自 3 例乳腺癌患者，由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心杨生永副教授提供，样本经病理学诊断证实术前均未进行放化疗治疗，-80 ℃冰箱中保存。人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株储存于重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心教研室，细胞来源为 ATCC(The American Type Culture Collection)，储存条件为-80 ℃或液氮环境。感受态细胞 DH5α 购自天根生化科技有限公司(CB101-01)。ADAR1-P110 质粒、ADAR1-P150 质粒与 pCMV 空白载体质粒均来自重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心杨生永副教授[12]。

1.1.2 试剂 无内毒素质粒小抽试剂盒购自美国 Omega 公司(D6948-01)，lipoFiter™ 脂质体转染试剂购自汉恒生物有限公司，RPMI-1640 培养基和胰酶均购自美国 Hyclone 公司，PAN 胎牛血清购自德国 PAN-Biotech GmbH 公司，8-Cl-Ado 购自上海起福生物科技有限公司，兔抗人 ADAR1 抗体购自 Abcam 公司，兔抗人 β-actin 购自 Bioworld 公司，辣根标记山羊抗兔 IgG、蛋白提取试剂盒和 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳配胶试剂、蛋白上样缓冲液、MTT 粉末、PBS 等均购自碧云天生物技术公司，DMSO 购自鼎国生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与细胞培养 取人乳腺癌 SK-BR-3 细胞，37 ℃水浴迅速融化，将冻存液移至离心管，800 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入 RPMI1640 含 10%胎牛血清的完全培养基重悬沉淀细胞，接种于培养瓶中置于 37 ℃、5%CO_2 恒温恒湿培养箱中培养。

1.2.2 蛋白免疫印迹分析 乳腺癌组织及癌旁组织加液氮研磨后，加入裂解液，用碧云天 BCA 试剂盒测定蛋白含量，各组取 40 μg 蛋白，95 ℃孵育箱 10 min 蛋白变性后，保存于-80 ℃中。SK-BR-3 细胞经 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 分别处理 0、12、24、48、72 h 后收获细胞，加入细胞裂解液，用碧云天 BCA 试剂盒测定蛋白含量，各组取 40 μg 蛋白，95 ℃孵育箱 10 min 蛋白变性后，保存于-80 ℃中。SK-BR-3 细胞转染质粒分为 ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组、pCMV 空载对照组、空白对照组 4 组，各质粒 3 μg 转染 12 h 后换新鲜培养液培养至 48 h 收获细胞，加入细胞裂解液，用碧云天 BCA 试剂盒测定蛋白含量，各组取 40 μg 蛋白，95 ℃孵育箱 10 min 蛋白变性后，保存于-80 ℃中。进行 SDS-PAGE 电泳(80 V，30 min；120 V，1.5 h)，转膜(250 mA，2.5 h)后用 5%脱脂奶粉液室温摇床上封闭 1 h，分别用一抗 β-actin(1∶1 000)、ADAR1(1∶1 000)4 ℃过夜孵育；二抗(1∶5 000)室温摇床孵育 1 h，采用蛋白凝胶成像分析仪或胶片曝光。

1.2.3 MTT 实验和形态学观察检测细胞增殖情况 通过 MTT 实验检测 8-Cl-Ado 对 SK-BR-3 细胞的增殖抑制作用，将处于对数生长期的乳腺癌 SK-BR-3 细胞加胰酶置于 37 ℃培养箱消化 3 min，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加 RPMI1640 完全培养基吹打重悬成单细胞悬液，血细胞计数板计数，以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中培养 24 h 后，更换含 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 的新鲜培养液培养 0、24、48、72 h，终止培养 4 h 前，加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL)，每组设 3 个复孔，终止前将孔内液体吸尽，加入 100 μL DMSO 溶液，室温摇床轻摇溶解 10 min，采用酶标仪计测量 490 nm 时吸光度(absorbance，A)值，实验重复 3 次；同时将加 8-Cl-Ado 组和不加 8-Cl-Ado 组培养 0、24、48 h 后，在倒置显微镜下观察 8-Cl-Ado 对 SK-BR-3 细胞的增殖的影响，并拍照保存。通过 MTT 实验检测 ADAR1 对 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖作用的影响，将 SK-BR-3 细胞以 2×10^5 个/孔接种 6 孔板，分为 ADAR1-P110/8-Cl-Ado 组、ADAR1-P150/8-Cl-Ado 组、pCMV/8-Cl-Ado 组、对照/8-Cl-Ado 组、空白对照组5 组培养，取对数生长期的各组细胞，以 5×10^3 个/孔铺 96孔板，每组设 3 个复孔，ADAR1-P110/8-Cl-Ado组、ADAR1-P150/8-Cl-Ado 组、pCMV/8-Cl-Ado 组、对照/8-Cl-Ado 组加入含 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 培养液培养 0、48 h，空白对照组加不含 8-Cl-Ado 的培养液培养 0、48 h。酶标仪测 $A_{490\,nm}$，实验重复 3 次，计算细胞的抑制率。细胞增殖抑制率=(1-实验组/空白对照组)×100%。

1.2.4 伤口愈合实验检测细胞迁移情况 通过伤口愈合实验检测 ADAR1 对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞迁移的影响，分为 ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组、pCMV 空载组、

空白对照组 4 组，每组均分为经加药和不加药 2 种处理。将 SK-BR-3 细胞以 2×10^5 个/孔接种 6 孔板，待细胞融合 70%~80%后转染质粒培养至 24 h。用 200 μL 移液器吸头在各孔划等宽痕迹，PBS 清洗尽细胞碎片，经加药和不加药的低血清培养基培养 0、48 h，在倒置显微镜下拍照。实验重复 3 次。迁移率=(0 h 宽度−48 h 宽度)/0 h 宽度×100%。

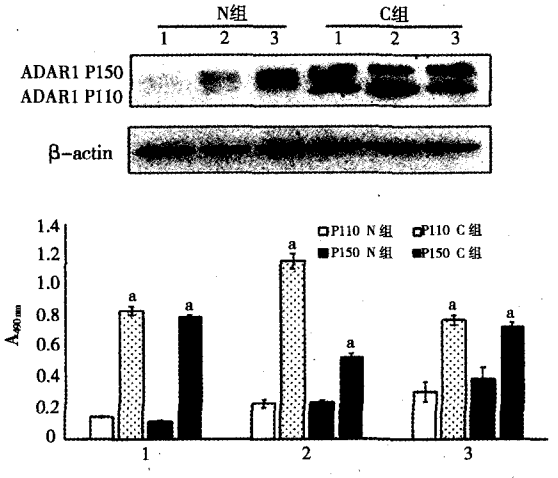
1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 22.0 软件分析，结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。Western blot 蛋白相对表达量均值比较采用两独立样本 t 检验；MTT 实验所测 $A_{490\,nm}$ 采用重复测量资料的方差分析；MTT 实验所测增殖抑制率采用单因素方差分析，均数间两两比较进行 LSD-t 检验；伤口愈合实验采用析因设计资料方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 ADAR1 在人乳腺癌细胞癌和癌旁组织中的表达分析

Western blot 检测 ADAR1 蛋白在 3 例原发性乳腺癌癌组织及癌旁组织中的表达，结果如图 1 所示，ADAR1-P110组和 ADAR1-P150 组蛋白在乳腺癌癌组织的表达量均明显高于癌旁组织(t=9.871，P=0.000；t=7.169，P=0.000)，提示ADAR1 蛋白的高表达可能与乳腺癌的发生发展密切相关。



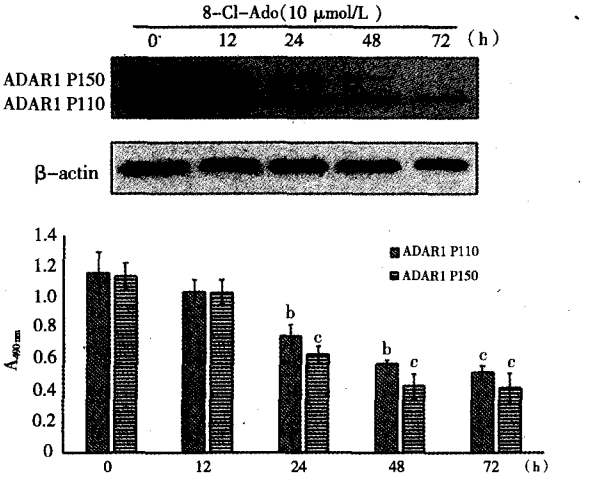
N组：乳腺癌旁组织(n=3)；C 组：乳腺癌癌组织(n=3)；1：乳腺癌组织 1 组；2：乳腺癌组织 2 组；3：乳腺癌组织 3 组；a，乳腺癌旁组织组与乳腺癌癌组织组两两比较，P=0.000

图 1 乳腺癌癌旁组织与配对的癌组织中 ADAR1 蛋白的表达情况

Fig.1 Expression of ADAR1 protein in breast adjacent normal tissues and cancer tissues

2.2 8-Cl-Ado 对 SK-BR-3 细胞中 ADAR1 蛋白表达水平的影响

Western blot 检测 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞不同时间(0、12、24、48、72 h)对 ADAR1 蛋白表达量的影响。结果如图 2 所示，SK-BR-3 细胞内 ADAR1 蛋白表达量随着 8-Cl-Ado 作用时间增加而明显降低。ADAR1-P110 与 ADAR1-P150 蛋白表达量分别在不同时间点之间两两比较，ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 蛋白表达量在 12 h 与 0 h 无明显差异(t=-3.080，P=0.091；t=-2.111，P=0.169)，ADAR1-P110 蛋白表达量在 24、48、72 h 与 0 h 相比均明显下降(t=-9.782，P=0.010；t=-8.838，P=0.013；t=-11.126，P=0.008)，ADAR1-P150 蛋白表达量在 24、48、72 h 与 0 h 相比均明显下降(t=-22.317，P=0.002；t=-19.866，P=0.003；t=-14.949，P=0.004)，而 ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 蛋白表达量在 72 h 与 48 h 相比无明显差异(t=-3.704，P=0.066；t=-0.908，P=0.460)。由此可以看出，ADAR1 蛋白表达量随 8-Cl-Ado 作用时间增加而明显下降，且作用 48 h 后细胞内 ADAR1 蛋白量下降得最为明显，72 h 后 ADAR1 蛋白表达水平与 48 h 基本保持相同，说明 8-Cl-Ado 可以下调乳腺癌 SK-BR-3 细胞内ADAR1 蛋白的表达量。



与 0 h 两两比较，a 表示 P<0.05；b 表示 P<0.01；c 表示 P<0.001

图 2 8-Cl-Ado 作用不同时间对乳腺癌 SK-BR-3 中 ADAR1 蛋白表达的影响

Fig.2 Inhibitory effect of 8-Cl-Ado on expression of ADAR1 protein in breast cancer cells SK-BR-3 for different times

2.3 8-Cl-Ado 对乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖的影响

用 MTT 实验检测 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞不同时间(0、24、48、72 h)对细胞增殖的影响，不加药组为空白对照组，加药组为实验组，酶标仪测各组 $A_{490\,nm}$，结果见表 1。重复测量方差分析可得：时间因素 F=203.409、P=0.000，时间×分组 F=317.915、P=0.000。不加 8-Cl-Ado 处理组和加 8-Cl-Ado 处理组在 24 h(t=10.668，P=0.009)、48 h(t=11.602，P=0.007)、72 h(t=67.800，P=0.000)两两比较均有统计学差异。结果表明，8-Cl-Ado 能明显抑制 SK-BR-3 乳腺癌细胞增殖，且存在时间依赖性。在倒置显微镜下观察8-Cl-Ado 对 SK-BR-3 细胞增殖的影响，由图 3 可以看出，8-Cl-Ado 能明显抑制 SK-BR-3 细胞的增殖。

表 1 MTT 法检测 8-Cl-Ado 不同时间对乳腺癌 SK-BR-3细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Effect of 8-Cl-Ado on breast cancer cells SK-BR-3 in time-dependent manner by MTT assay（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
不加药组	0.263 ± 0.003	0.510 ± 0.030	0.747 ± 0.059	1.225 ± 0.032
加药组	0.263 ± 0.003	0.373 ± 0.031[a]	0.332 ± 0.009[a]	0.180 ± 0.007[a]

注：a，加药组与不加药组两两比较有统计学意义（P<0.05）

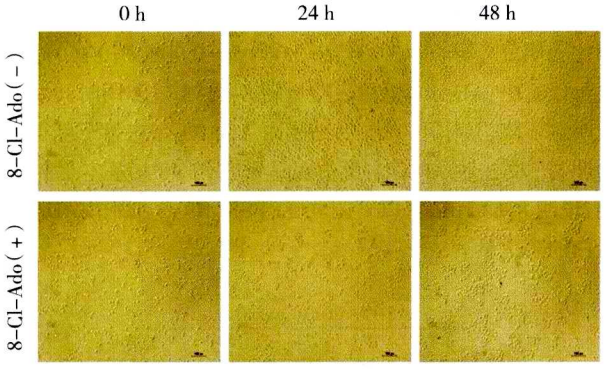


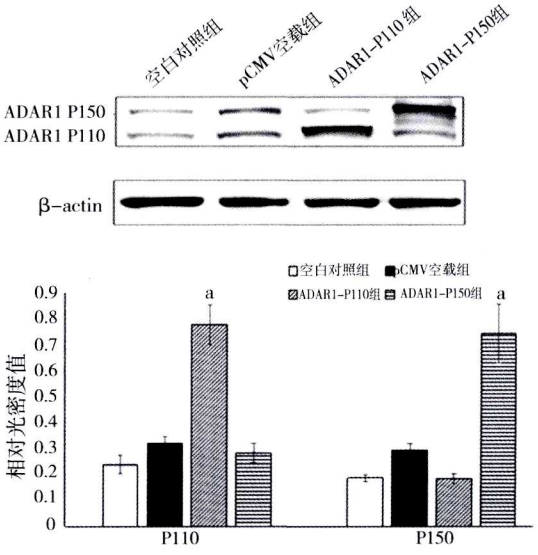
图 3 8-Cl-Ado 不同时间对 SK-BR-3 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of 8-Cl-Ado on the proliferation of SK-BR-3 cells at different time points

以上结果与前面 Wetern blot 检测 8-Cl-Ado 处理 SK-BR-3 细胞不同时间后 ADAR1 蛋白表达量变化的结果共同分析，可得出以下结论：随着 8-Cl-Ado 作用时间增加，SK-BR-3 细胞内 ADAR1 蛋白表达量逐渐降低，细胞的增殖抑制率逐渐升高，提示 ADAR1 蛋白表达下调可能在 8-Cl-Ado 抗乳腺癌作用中产生作用，为后续实验提供理论基础，为 8-Cl-Ado 抗肿瘤作用找到新靶点，且进一步阐明 8-Cl-Ado 抗肿瘤的作用机制。

2.4 ADAR1 过表达对 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖的影响

SK-BR-3 细胞中 ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 质粒过表达，Western blot 结果如图 4 所示，空白对照组的ADAR1-P110 和 ADAR1-P150 表达量分别与 pCMV 空载组相比均无统计学意义（t=2.422，P=0.136；t=5.163，P=0.036）。ADAR1-P110 过表达质粒组的 ADAR1-P110 表达量和 ADAR1-P150 过表达质粒组的 ADAR1-P150 表达量分别与空白对照组相比均有意义（t=9.202，P=0.012；t=7.759，P=0.016）。SK-BR-3 细胞经 ADAR1-P110、ADAR1-P150 过表达质粒和 pCMV 质粒转染培养至 24 h 后铺 96 孔板，MTT 法检测 ADAR1 过表达对 8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 细胞 48 h 的增殖抑制的影响，用酶标仪测出各组 $A_{490\,nm}$，重复 3 次，计算出各处理组细胞 48 h 的抑制率，见表 2。组间单因素方差分析有统计学意义（F=25.361，P=0.000），后行 LSD-t 组间两两比较：10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用对照组和 pCMV 空载组 48 h（P=0.969）后抑制率基本一致。10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用ADAR1-P110 组 48 h 后细胞抑制率的分别与对照组相比明显降低（P=0.000）；10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用 ADAR1-P150 组 48 h 后的细胞抑制率分别与对照组相比明显降低（P=0.000）。实验结果说明 ADAR1 过表达能够减弱 8-Cl-Ado 对乳腺癌 SK-BR-3 细胞生长增殖的抑制作用，说明 ADAR1 与 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖的作用机制相关，提示 ADAR1 可能是 8-Cl-Ado 抗肿瘤作用的新靶点。



a：与空白对照组两两比较，P = 0.00 0

图 4 ADAR1（P110/P150）质粒过表达情况

Fig.4 Over-expression of ADAR1(P110/P150) pasmid

表 2 MTT 法检测 ADAR1 过表达对 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖的影响（n=3，$\bar{x}\pm s$，%）

Tab.2 Effects of over-expression of ADAR1 pasmid on 8-Cl-Ado inhibiting SK-BR-3 cells proliferation by MTT assay（n=3，$\bar{x}\pm s$，%）

组别	48 h 抑制率
对照 /8-Cl-Ado 组	69.61 ± 2.03
pCMV/8-Cl-Ado 组	69.50 ± 3.66
ADAR1 P110/8-Cl-Ado 组	52.85 ± 3.56[ab]
ADAR1 P150/8-Cl-Ado 组	53.83 ± 3.37[ab]
F 值	25.361
P 值	0.000

注：a，与对照组两两比较有统计学意义，P<0.05；b：与 pCMV 组两两比较有统计学意义，P<0.05

2.5 ADAR1 过表达对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞迁移的影响

SK-BR-3 细胞分为空白对照组、pCMV 空载组、ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组 4 组划痕，每组分别不加药和加药处理 48 h，在倒置显微镜下拍照，结果如图 5 所示。重复 3 次，计算出各组 48 h 的迁移率，见表 3。统计学结果分析如下：析因方差分析可得，质粒因素（F=212.762，P=0.000）、药物

因素（F=1079.919，P=0.000）、质粒因素×药物因素（F=69.561，P=0.000），表明 SK-BR-3 细胞的 48h 迁移率受到质粒和药物两个因素的显著影响；组间比较进行 Bonferroni 校正，空白对照组的不加药、加药 48 h 迁移率和 pCMV 空载组比较，无统计学意义（P=0.407，P=1.000），即转染空载质粒对细胞迁移无影响；ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组的不加药、加药 48 h 迁移率分别与空白对照组相比均明显升高（P=0.000，P=0.000），表明 ADAR1 过表达能促进 SK-BR-3 癌细胞的迁移。空白对照组、pCMV 空载组、ADAR1-P110 组、ADAR1-P150 组的不加药 48 h 迁移率与加药 48 h 迁移率两两比较均有统计学意义（t=51.212，P=0.000；t=41.103，P=0.001；t=12.484，P=0.006；t=6.157，P=0.025），表明 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 显著抑制 SK-BR-3 细胞的迁移能力。结合 Western blot 得出 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用 48 h 能使 ADAR1 蛋白的表达明显下降的结论，表明了 8-Cl-Ado 可以通过下调 ADAR1 来抑制癌细胞的迁移能力。

表 3　SK-BR-3 细胞不同处理后的 48 h 迁移率的检测（n=3，$\bar{x} \pm s$，%）

Tab.3　48 h migration rate of SK-BR-3 cells under different conditions（n=3，$\bar{x} \pm s$，%）

组别	不加药组 48 h 迁移率	加药组 48 h 迁移率
空白对照组	61.26 ± 1.04	10.41 ± 2.63[c]
pCMV空载组	58.98 ± 1.70	8.99 ± 2.10[c]
ADAR1-P110组	72.88 ± 0.51[ab]	58.56 ± 1.49[abc]
ADAR1-P150组	70.55 ± 1.67[ab]	43.88 ± 5.49[abc]

注：a，与空白对照组两两比较有统计学意义，P<0.05；b：与 pCMV 空载组两两比较比较有统计学意义，P<0.05；c：加药组与不加药组两两比较有统计学意义，P<0.05

3　讨　论

乳腺癌是全球女性最常见的癌症之一，在全球范围的恶性肿瘤中位居第三，乳腺癌的危害及其发展趋势受到社会经济发展、环境和生活方式的改变以及人口老龄化程度等诸多因素的影响。中国过去 30 年中女性乳腺癌死亡率呈持续上升的趋势[13]，乳腺癌现已成为女性第一大恶性肿瘤。

本研究发现乳腺癌癌组织中 ADAR1 的表达水平明显高于正常癌旁组织，提示 ADAR1 高表达可能与乳腺癌的发生发展密切相关。8-Cl-Ado 能明显抑制乳腺癌细胞增殖，并呈时间依赖性；同时 10 μmol/L 的 8-Cl-Ado 作用 SK-BR-3 乳腺癌细胞 48 h 后能明显降低乳腺癌细胞 SK-BR-3 中 ADAR1 蛋白的表达，表明 ADAR1 的表达下调可能与 8-Cl-Ado 的抗乳腺癌的作用机制相关。为进一步研究 ADAR1 是否参与 8-Cl-Ado 对 SK-BR-3 细胞增殖抑制的过程，ADAR1 质粒过表达后分析其对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞增殖和迁移能力的影响，通过 MTT 实验检测 ADAR1 过表达对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞增殖的影响，以及通过划痕实验检测 ADAR1 对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞迁移的影响，结果显示 ADAR1 过表达组与空白对照组相比，ADAR1 高表达能明显减弱 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞的增殖和迁移能力。

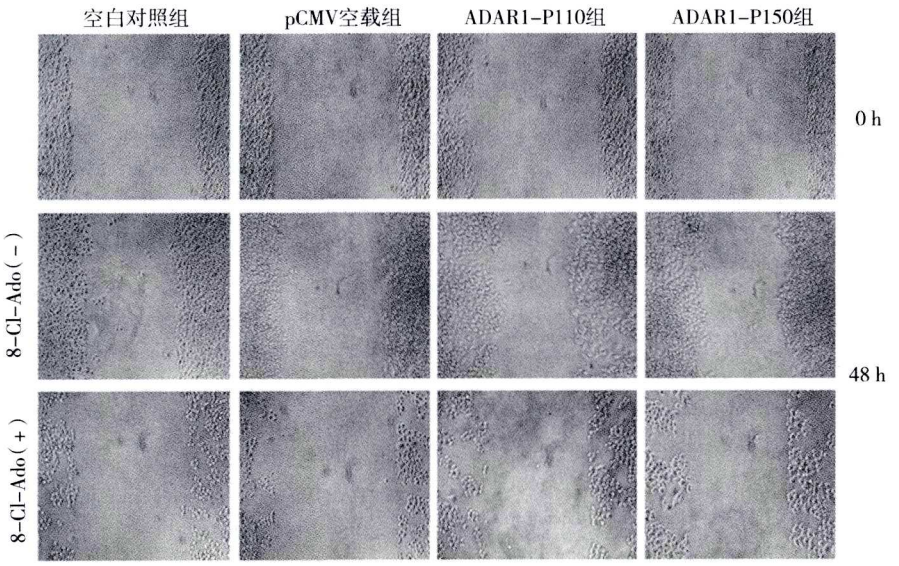


图 5　ADAR1（P110/P150）质粒过表达对 8-Cl-Ado 抑制 SK-BR-3 细胞迁移的影响（100×）

Fig.5　Effects of over-expressed ADAR1(P110/P150) pasmid on 8-Cl-Ado inhibiting SK-BR-3 cells migration(100×)

寻找高效低毒的抗肿瘤药物是治疗肿瘤研究的目标之一，8-Cl-Ado 是一个有临床应用前景的药物，据相关报道[14-15]，8-Cl-Ado 能通过腺苷激酶和其他的酶持续磷酸化后生成其 ATP 类似物 8-Cl-ATP，8-Cl-ATP 可以与 RNA 直接结合成链终止子，抑制 RNA 聚合酶的作用，使 mRNA 转录过程受阻，并消耗大量能量，从而导致细胞的死亡。目前有研究表明[16]，肿瘤中 A-to-I RNA 编辑的失调可能是诱导癌基因上调或抑癌基因下调的因素之一。ADAR1 能介导 A-to-I RNA 编辑，而大多数 A-to-I RNA 编辑位点发生在 mRNA 前体或 mRNA 的非编码区和非编码 RNA。MicroRNA 属于非编码 RNA，其在肿瘤中的异常表达是近些年来的研究热点，主要是由基因组缺失、突变或扩增所引起；此外，microRNA 的表达异常也受转录水平的调控。有研究发现[17-18]，ADAR1 能够调控 microRMA 的表达，影响肿瘤的生长。因此，本研究猜想 8-氯腺苷可能抑制 ADAR1 基因的转录过程，使 ADAR1 蛋白的表达降低，影响 ADAR1 介导 A-to-I RNA 编辑调控 micro RNA 靶向信号通路受体的过程，最终抑制肿瘤的生长和增殖。

本研究发现，8-Cl-Ado 对乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞增殖和迁移的抑制作用明显，其作用与 ADAR1 表达下调有关，提示 ADAR1 可能成为研究 8-Cl-Ado 抗乳腺癌作用机制的新靶点，为进一步在 ADAR1 调控 microRNA 靶向信号通路这一方向上研究 8-Cl-Ado 抑制乳腺癌生长和增殖的作用机制提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] Robinson-White AJ, Hsiao HP, Leitner WW, et al. Protein kinase A-independent inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human thyroid cancer cells by 8-Cl-adenosine[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(3): 1020-1029.

[2] Robinson-White AJ, Bossis I, Hsiao HP, et al. 8-Cl-adenosine inhibits proliferation and causes apoptosis in B-lymphocytes via protein kinase A-dependent and independent effects: implications for treatment of carney complex-associated tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(10): 4061-4069.

[3] Han YY, Zhou Z, Cao JX, Jet al. E2F1-mediated DNA damage is implicated in 8-Cl-adenosine-induced chromosome missegregation and apoptosis in human lung cancer H1299 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 384(1-2): 187-196.

[4] Stellrecht CM, Vangapandu HV, Le XF, et al. ATP directed agent, 8-chloro-adenosine, induces AMP activated protein kinase activity, leading to autophagic cell death in breast cancer cells[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 23.

[5] Avesson L, Barry G. The emerging role of RNA and DNA editing in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845(2): 308-316.

[6] Qi L, Chan TH, Tenen DG, et al. RNA editome imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1301-1306.

[7] Han SW, Kim HP, Shin JY, et al. RNA editing in RHOQ promotes invasion potential in colorectal cancer[J]. J Exp Med, 2014, 211(4): 613-621.

[8] Mo F, Wyatt AW, Sun Y, et al. Systematic identification and characterization of RNA editing in prostate tumors[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101431.

[9] Sharma PM, Bowman M, Madden SL, et al. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1[J]. Genes Dev, 1994, 8(6): 720-731.

[10] Steinman RA, Yang Q, Gasparetto M, et al. Deletion of the RNA-editing enzyme ADAR1 causes regression of established chronic myelogenous leukemia in mice[J]. Int J Cancer, 2013, 132(8): 1741-1750.

[11] 马 俊，侯小强，郑秋生，等. DNA 修复酶基因 NEIL1 的 A-I+ RNA 编辑水平在白血病和乳腺癌细胞中的下调[J]. 军事医学，2014，38(6)：458-462.

[12] Yang S, Deng P, Zhu Z, et al. Adenosine deaminase acting on RNA 1 limits RIG-I RNA detection and suppresses IFN production responding to viral and endogenous RNAs[J]. J Immunol, 2014, 193(7): 3436-3445.

[13] 郑 莹，吴春晓，吴 凡. 中国女性乳腺癌死亡现况和发展趋势[J]. 中华预防医学杂志，2011，45(2)：150-154.

[14] Dennison JB, Balakrishnan K, Gandhi V, et al. Preclinical activity of 8-chloroadenosine with mantle cell lymphoma: roles of energy depletion and inhibition of DNA and RNA synthesis[J]. Br J Haematol, 2009, 147(3): 297-307.

[15] Dennison JB, Ayres ML, Kaluarachchi K, et al. Intracellular succinylation of 8-chloroadenosine and its effect on fumarate levels[J]. J Biol Chem, 2010, 285(11): 8022-8030.

[16] 张 颖. A-to-I RNA 编辑调控肿瘤相关基因的机制研究[D]. 合肥：安徽大学，2012：1-64.

[17] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinioma reveals miR-199a/b-3p astherapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2011, 19(2): 232-243.

[18] Nemlich Y, Greenberg E, Ortenberg R, et al. MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth[J]. J Clin Invest, 2013, 123(6): 2703-2718.

（责任编辑：张辉洁）