DOI:10.16016/j.2097-0927.202309052

腺苷脱氨酶 ADAR1 调控肺腺癌细胞放射敏感性的研究

陈 才,杨文娣,陈柯宏,张雅倩,曾 洪,彭 媛,张晓月,杨镇洲 400000 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤中心

[摘要] **目的** 研究下调 ADAR1 基因表达对肺腺癌细胞放射敏感性的影响。**方法** 慢病毒转染下调肺腺癌细胞 A549 的 ADAR1 基因,分别设阴性对照组(shNC)和 ADAR1 敲降组(shADAR1),同时以单次剂量 0 Gy 和 6 Gy X 射线照射为干预条件。采用蛋白免疫印迹和 RT-qPCR 分别检测 A549 细胞转染后 ADAR1 的蛋白和 mRNA 表达水平。CCK-8 实验、伤口愈合实验及 Transwell 迁移实验检测细胞增殖、迁移能力。克隆形成实验检测下调 ADAR1 对 A549 细胞放射敏感性的影响。流式细胞术、蛋白免疫印迹实验检测细胞凋亡及相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达水平。细胞免疫荧光、蛋白免疫印迹实验检测 γ-H2AX 的表达水平。彗星实验检测细胞 DNA 损伤程度。4~6 周、体质量 16~18 g 雌性裸鼠 12 只,用随机数表法分为($n=3$):shNC 组、shADAR1 组、阴性对照联合电离辐射(Ionizing radiation,IR)组(shNC+IR)和 ADAR1 敲低联合 IR 组(shADAR1+IR),通过皮下成瘤实验检测不同组细胞在体内生长情况。**结果** 蛋白免疫印迹和 RT-qPCR 实验显示 A549 shADAR1 细胞 ADAR1 的蛋白及 mRNA 表达量均明显降低($P<0.05$)。CCK-8 实验、伤口愈合实验及 Transwell 迁移实验结果显示下调 ADAR1 抑制 A549 细胞的增殖、迁移能力,IR 后这种抑制趋势更加明显($P<0.01$)。细胞克隆形成实验结果显示随着辐射剂量增加,两组的克隆形成率均有下降,但 shADAR1 组形成的克隆数低于 shNC 组。流式细胞术及蛋白免疫印迹实验结果显示下调 ADAR1 增加 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达($P<0.01$),减少 Bcl-2 蛋白表达($P<0.05$),IR 后 A549 shADAR1 细胞凋亡率、Bax 蛋白水平进一步升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白水平进一步降低($P<0.01$)。A549 shADAR1 细胞经 IR 后 γ-H2AX foci 数目及蛋白表达量明显升高($P<0.05$),彗星实验结果显示 A549 shADAR1 细胞经 IR 后 DNA 损伤更加明显($P<0.01$)。裸鼠皮下成瘤实验结果显示 A549 shADAR1 细胞皮下成瘤经 IR 后其生长受到明显抑制($P<0.01$)。**结论** 下调 ADAR1 可显著抑制 IR 后 A549 细胞的增殖、迁移,促进细胞凋亡及 DNA 损伤,从而增加肺腺癌细胞的放射敏感性。

[关键词] ADAR1;放射敏感性;肺腺癌;DNA 损伤
[中图法分类号] R394-33; R730.55; R734.2 [文献标志码] A

Adenosine deaminase acting on RNA-1 regulates the radiosensitivity of lung adenocarcinoma cells

CHEN Cai, YANG Wendi, CHEN Kehong, ZHANG Yaqian, ZENG Hong, PENG Yuan, ZHANG Xiaoyue, YANG Zhenzhou Cancer Center, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of down-regulating adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) on the radiosensitivity of lung adenocarcinoma cells. **Methods** Lentiviral transfection was used to establish an ADAR1 knockdown cell line based on A549 cells. Then the cells were divided into negative control (shNC) and ADAR1 knockdown (shADAR1) groups, which were followed by a single-dose irradiation of 0 Gy and 6 Gy X-rays. Western blotting and RT-PCR were utilized to detect the expression of ADAR1 at protein and mRNA levels, respectively. CCK-8 assay, wound healing assay and Transwell

[基金项目] 国家自然科学基金(82273572),重庆市自然科学基金(CSTC2021jscx-gksb-N0022)
[通信作者] 杨镇洲,E-mail:yangzz@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

migration assay were applied to measure cell proliferation and migration abilities. Meanwhile, clone formation assay was performed to detect the effect of down-regulating ADAR1 on the radiosensitivity of A549 cells. Flow cytometry and Western blotting were conducted to detect the expression levels of apoptosis and apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2. Immunofluorescence assay and Western blotting were used to detect the expression level of γ-H2AX. Comet assay was performed to detect the level of cellular DNA damage. Twelve female nude mice (4~6 weeks old, weighing 16~18 g) were divided into shNC group, shADAR1 group, shNC+ ionizing radiation (IR) group and shADAR1+IR group, with 3 mice in each group. The growth of tumor of different groups was observed with subcutaneous tumorigenesis assay. **Results** Western blotting and RT-qPCR showed that the protein and mRNA expression of ADAR1 were significantly reduced in A549 shADAR1 cells ($P<0.05$). CCK-8 assay, wound healing assay and Transwell migration assay indicated that down-regulation of ADAR1 inhibited the proliferation and migration abilities of A549 cells, and this inhibition trend became more obvious ($P<0.01$) after IR. Cell clone formation assay showed that the clone formation rate of both groups was decreased, with the increase of radiation dose. But the number of formed clones was lower in the shADAR1 group than the shNC group. Flow cytometry and Western blotting displayed that down-regulation of ADAR1 increased the apoptotic rate and Bax expression in A549 cells ($P<0.01$) and decreased Bcl-2 expression ($P<0.05$), and the apoptotic rate and Bax protein level were further increased in A549 shADAR1 cells after IR ($P<0.01$), and the Bcl-2 protein level was further decreased ($P<0.01$). The number of γ-H2AX foci and protein level in A549 shADAR1 cells were significantly increased after IR ($P<0.05$), and the results of comet assay showed that the DNA damage was more obvious in A549 shADAR1 cells after IR ($P<0.01$). Subcutaneous tumorigenesis assay in nude mice showed that the growth of subcutaneous tumour of A549 shADAR1 cells was significantly inhibited after IR ($P<0.01$). **Conclusion** Down-regulation of ADAR1 significantly inhibits the proliferation and migration of A549 cells after IR and promotes apoptosis and DNA damage, and thereby increases the radiosensitivity of lung adenocarcinoma cells.

[**Key words**] ADAR1; radiosensitivity; lung adenocarcinoma; DNA damage

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82273572) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSCT2021jscx-gksb-N0022).
Corresponding author: YANG Zhenzhou, E-mail: yangzz@cqmu.edu.cn

肺癌是导致癌症相关死亡的最常见原因[1],中国肺癌的新发病例和癌症相关死亡人数在所有癌症中均占比第一[2]。大约85%的肺癌病理类型为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC),其中肺腺癌(lung adenocarcinoma,LUAD)是最主要的病理类型[3],5年生存率低于20%[4]。放射治疗是治疗LUAD的有效方法,但绝大多数LUAD患者在接受放射治疗后会产生放射抵抗,导致治疗失败[5]。因此,寻找提高肺腺癌细胞放射敏感性的有效方法至关重要。

RNA编辑是哺乳动物中广泛存在的转录后修饰,是肿瘤生物学的一种重要机制[6]。RNA特异性腺苷脱氨酶1(adenosine deaminase acting on RNA-1,ADAR1)是一种RNA编辑酶,催化腺苷脱氨为肌苷(A-to-I)[7],其过度编辑现象发生在许多癌症中,如肺癌[8]、肝癌[9]、慢性粒细胞白血病[10]、食管癌[11],且大多数促进癌症进展,本课题组前期研究表明肺腺癌患者ADAR1表达水平升高,且与淋巴结转移相关[12]。有研究表明,缺失ADAR1的黑色素瘤细胞经电离辐射(Ionizing radiation,IR)后在动物体内生长受到明显抑制[13],提示ADAR1的缺失与肿瘤细胞的放射敏感性相关,而ADAR1如何影响肿瘤细胞的放射敏感性,其具体机制尚不清楚。因此,本研究通过慢病毒感染肺腺癌细胞,建立低表达ADAR1基因的稳定细胞株,探究ADAR1基因对肺腺癌细胞放射敏感性的影响,以期为肺腺癌放射治疗提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂

人肺腺癌细胞系A549(购自美国ATCC公司),慢病毒质粒载体及转染试剂盒(购自汉恒生物公司),CCK-8试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(购自碧云天公司),胎牛血清(购自硕华公司),DMEM培养基(购自源培生物公司),γ-H2AX、GAPDH、Tubulin抗体(购自美国Cell Signaling Technology公司),Bax、Bcl-2抗体(购自美国Affinity Biosciences公司),荧光二抗

(购自美国 Invitrogen 公司),RNA 快速提取试剂盒、反转录试剂预混液、PCR 试剂盒(购自艾科瑞生物公司),彗星分析试剂盒(购自美国 Cell Biolabs 公司)。

1.2 细胞培养及慢病毒转染

人肺腺癌细胞 A549 在含有 10%FBS 和 1%青-链霉素的 DMEM 培养基,5%CO_2,37 ℃的加湿培养箱中培养。通过转染试剂将慢病毒质粒载体转染到 A549 细胞中,并经过 1 μg/mL 嘌呤霉素筛选出慢病毒转染的 A549 细胞。ADAR1 基因敲降序列:5′-GCCCACTG-TTATCTTCACTTT-3′;空白对照序列:5′-TCTCGCTTGG-GCGAGTAAG-3′。

1.3 辐射条件

利用直线加速器(Infinity,日本),以单次剂量 6 Gy X 射线照射细胞,照射条件:室温,6 Mv,剂量率 400 cGy/min,源靶距 100 cm,照射面积 20 cm×20 cm,射影覆盖全部细胞,培养皿上方放置 1 cm 的补偿板。

1.4 CCK-8 实验

将 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,在细胞培养箱中培养 24 h,IR 处理后 24、48 和 72 h,分别每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 2 h 后,多功能酶标仪(Molecular Devices,美国)测定光密度 D(450)。

1.5 伤口愈合实验

将 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞接种到 6 孔板中,经 IR 处理,当细胞密度达到 80%时,更换为无血清培养基,饥饿过夜。然后用无菌 10 μL 移液器枪头垂直于孔底均匀划痕,PBS 清洗去除细胞碎片,在 0、24 h 通过倒置荧光显微镜(Olympus,日本)采集图像。

1.6 Transwell 迁移实验

用无血清培养基饥饿培养 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞 24 h 后,重悬细胞到 2.5×10^5 个/mL,于 Transwell 小室上室中加入 200 μL,小室下室中加入 500 μL 含 10%FBS 的完全培养基,经 IR 处理 24 h 后,用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,结晶紫染色 10 min,用棉签去除小室上室细胞,应用倒置显微镜采集图像。在 5 个随机选择的视野中计算迁移细胞数目。

1.7 克隆形成实验

将对数生长的 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞分别以每孔 400、800、1200、1 600、2 000 个细胞数接种于 6 孔板,设置 3 个复孔。细胞贴壁以后,分别给予 0、2、4、6、8 Gy 的单次剂量照射,并继续培养 13~14 d,每 3~5 d 换液。菌落形成后,用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,结晶紫染色 20 min,统计至少含 50 个细胞的菌落数量。计算克隆形成率(plating efficiency,PE)=菌落数/接种的细胞数×100%,存活分数(survival fraction,SF)=实验组 PE/对照组 PE,通过多靶点单击模型拟合细胞存活曲线。

1.8 流式细胞术

将 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞(1×10^5 个/孔)在 6 孔板中培养过夜,经 IR 处理后,继续培养 24 h,重悬细胞,用 PBS 清洗细胞 2 次,再参照试剂盒说明书,使用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 染色,通过流式细胞仪检测(Beckman,美国)不同组细胞凋亡。

1.9 蛋白免疫印迹实验

利用 RIPA 缓冲液裂解不同组细胞提取蛋白质,通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质浓度。使用 12%SDS-PAGE 分离细胞蛋白质(每孔 20 μg),然后转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,与 γ-H2AX 抗体(1∶1 000),Bax 抗体(1∶1 000),Bcl-2 抗体(1∶1 000)在 4 ℃下孵育过夜。随后将膜与二抗在室温下孵育 1 h,通过与 ECL 化学发光底物检测试剂反应,最终在凝胶成像仪成像。

1.10 RT-qPCR 实验

根据 RNA 快速提取试剂说明书提取 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞 RNA,使用反转录试剂预混液合成 cDNA,然后利用 cDNA,进行 RT-qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达。引物序列如下:ADAR1,正向:5′-TCTGACTCCTCTGCCCTGAA-3′,反向:5′-TATGGGAGGGGTTGTCCCTT-3′;β-actin:正向:5′-TGGCACCCAGCACAATGAA-3′,反向:5′-CTAAGTC-ATAGTCCGCCTAGAAGCA-3′。

1.11 细胞免疫荧光染色

将 0.5×10^5 个细胞的 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞接种到带有细胞爬片的 24 孔板中,待贴壁后,IR 处理 2 h,用 PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛固定 20 min,0.2%Triton X-100 孵育 5 min,5% BSA 在室温下封闭 1 h,然后将细胞爬片与兔抗人 γ-H2AX 抗体(1∶200)在 4 ℃下孵育过夜。与羊抗兔荧光二抗(1∶1 000)在室温避光中孵育 1 h,然后用 DAPI 染色 15 min,抗荧光淬灭剂封片,用正置荧光显微镜(Olympus,日本)采集荧光图。

1.12 彗星实验

将 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞分别以 0、6 Gy X 线照射 2 h 后重悬细胞并置于冰上,根据彗星分析试剂盒实验步骤说明书进行修改,对每份样本的 1.5×10^4 个细胞进行碱性彗星实验,并用荧光显微镜采集图像。通过 ImageJ OpenComet 软件分析每个样本中随机 50 个细胞。

1.13 裸鼠皮下成瘤

选择 12 只,4~6 周龄 SPF 级(无特定病原体)雌

性裸鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,[许可证号 SCXK(湘)2019-0004],体质量 16~18 g,适应新环境 1 周。将对数生长期的 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞用无血清培养基洗涤两次,制备成单细胞悬液(1×10^7 个,100 μL PBS),按照随机数字表法分组,皮下注射至每只小鼠的左侧腋窝外侧。当肿瘤大小达到约 5 mm×5 mm×5 mm 时,用 6 Gy X 射线照射肿瘤。每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤直径,并使用公式(体积=1/2×长度×宽度^2)计算肿瘤体积。30 d 后,解剖肿瘤并用 4%多聚甲醛固定以分析病理。所有动物实验均得到重庆医科大学附属第二医院动物实验伦理委员会批准。

1.14 统计学方法

本研究使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图和分析不同组细胞 ADAR1 蛋白及 mRNA 表达水平,增殖、迁移、凋亡能力,Bax、Bcl-2、H2AX 蛋白表达水平和成瘤体积、体质量,使用 Image J 软件分析 DNA 损伤水平,两组间的比较进行独立样本 t 检验,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染 A549 细胞,构建稳定转染的 A549 shADAR1 细胞

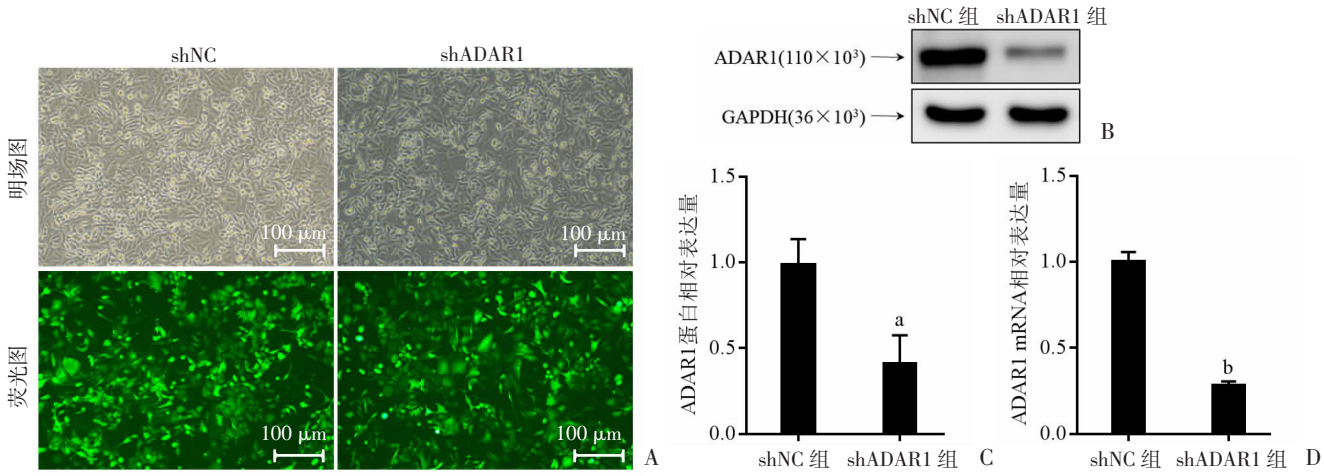
慢病毒转染 A549 细胞 3 d,经 1 μg/mL 嘌呤霉素筛选 4 d 后荧光显微镜观察显示:A549 shNC 细胞和 A549 shADAR1 细胞均有极强绿色荧光强度(图 1A)。免疫印迹实验和 RT-qPCR 实验检测 ADAR1 蛋白及 mRNA 表达水平,与 A549 shNC 组比较,A549 shADAR1 组细胞的 ADAR1 蛋白及 mRNA 表达水平明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1B~D)。

2.2 下调 ADAR1 显著抑制 IR 后 A549 细胞增殖、迁移

CCK-8 实验结果显示:下调 ADAR1 后 A549 细胞的增殖能力下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),而在 IR 后 A549 shADAR1 细胞的增殖能力进一步受到抑制($P<0.01$,图 2A、B),提示下调 ADAR1 抑制 IR 后 A549 细胞的增殖能力。伤口愈合实验和 Transwell 实验检测结果显示:下调 ADAR1 后 A549 细胞的迁移能力下降($P<0.01$),而在 IR 后 A549 shADAR1 细胞的迁移能力进一步受到抑制($P<0.01$,图 2C~F)。

2.3 下调 ADAR1 显著增加 A549 细胞的放射敏感性

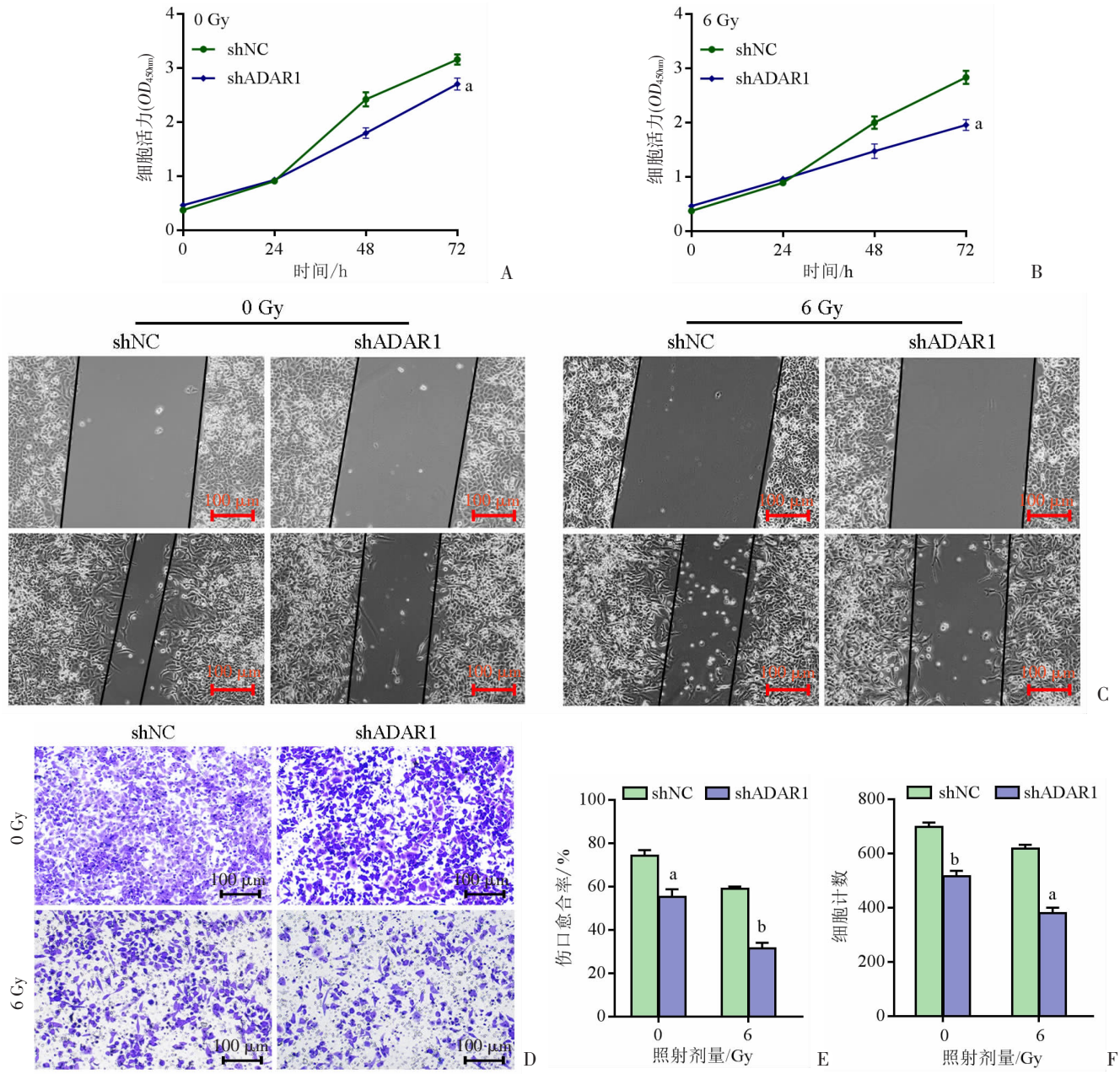
克隆形成实验用于评估细胞增殖能力,同时是检测细胞放射敏感性的重要标准。与 A549 shNC 组比较,A549 shADAR1 组在不同剂量(0、2、4、6 和 8 Gy)X 射线照射后形成的细胞克隆数量明显减少;在相同照射剂量下细胞的集落形成能力受到更强的抑制(图 3)。提示下调 ADAR1 可提高 A549 细胞的放射敏感性。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 shNC 组比较

A:慢病毒转染 A549 细胞的绿色荧光强度;B:蛋白免疫印迹实验检测慢病毒转染 A549 细胞后 ADAR1 蛋白表达水平;C:ADAR1 蛋白表达的定量分析;D:RT-qPCR 实验检测慢病毒转染 A549 细胞后 ADAR1 mRNA 表达水平

图 1 A549 细胞感染 ADAR1-shRNA 慢病毒后转染效率及感染后 ADAR1 蛋白和 mRNA 水平检测 ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)



a:P<0.01,b:P<0.001,与 shNC 组比较

A、B:CCK-8 实验检测 A549 shADAR1 细胞与 A549 shNC 细胞在 IR 后细胞增殖能力;C、E:伤口愈合实验检测 A549 shADAR1 细胞和 A549 shNC 细胞在 IR 后的迁移能力;D、F:Transwell 迁移实验检测 A549 shADAR1 细胞和 A549 shNC 细胞在 IR 后的迁移能力

图 2 下调 ADAR1 抑制 IR 后 A549 细胞增殖、迁移 ($\bar{x}\pm s$,n=3)

2.4 下调 ADAR1 显著增加 IR 后 A549 细胞的凋亡

分别给予 0、6 Gy X 射线照射 A549 shNC、A549 shADAR1 细胞 24 h 后,流式细胞术检测显示:IR 组细胞凋亡率较非 IR 组明显增大(P<0.001),shADAR1+IR 组较 shNC+IR 组凋亡率升高(P<0.05),提示下调 ADAR1 促进 IR 诱导 A549 细胞凋亡(4A、B)。免疫印迹实验结果显示:IR 组较非 IR 组 Bax 蛋白表达明显升高(P<0.001),Bcl-2 蛋白表达明显降低(P<0.001);shADAR1+IR 组较 shNC+IR 组 Bax 蛋白表达升高(P<0.05),Bcl-2 蛋白表达降低(P<0.005),见图 4C~E。表明下调 ADAR1 显著增加 IR 诱导 A549 细胞凋亡,提高细胞的放射敏感性。

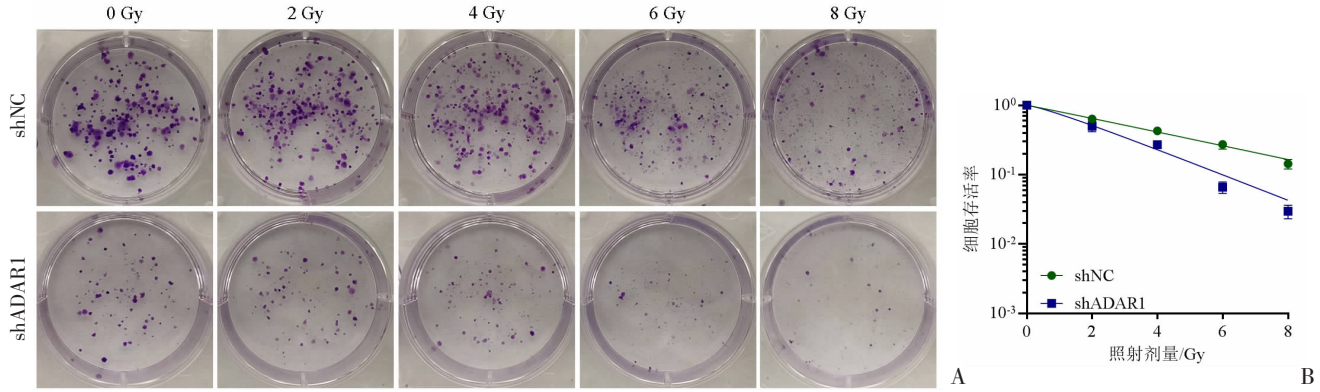
2.5 下调 ADAR1 诱导 A549 细胞的 DNA 损伤

IR 损伤主要通过诱导 DNA 损伤介导,因此进一步评估 ADAR1 介导的肺腺癌细胞放射敏感性增强是否与 DNA 损伤增加相关。对对数生长期的 A549

shNC 和 A549 shADAR1 细胞分别给予 0、6 Gy X 射线照射,2 h 后进行彗星实验检测(图 5A),结果表明下调 ADAR1 可引起 DNA 损伤,这与既往报道相一致[14-15]。IR 处理后 A549 shADAR1 细胞具有更长的拖尾,彗星尾部 DNA 占比更高(图 5A、D),提示 DNA 损伤更为严重。γ-H2AX 是重要的 DNA 双链断裂(DNA double-strand break,DSB)的标志物[16],图 5C 为照射后 2 h,γ-H2AX foci 荧光染色代表图,图 5B、E 为照射后 2 h,γ-H2AX 蛋白表达情况,均可发现 γ-H2AX 表达量明显升高($P<0.05$),表明下调 ADAR1 联合 IR 可通过诱导更多 DBS 从而增加 A549 细胞的 DNA 损伤。

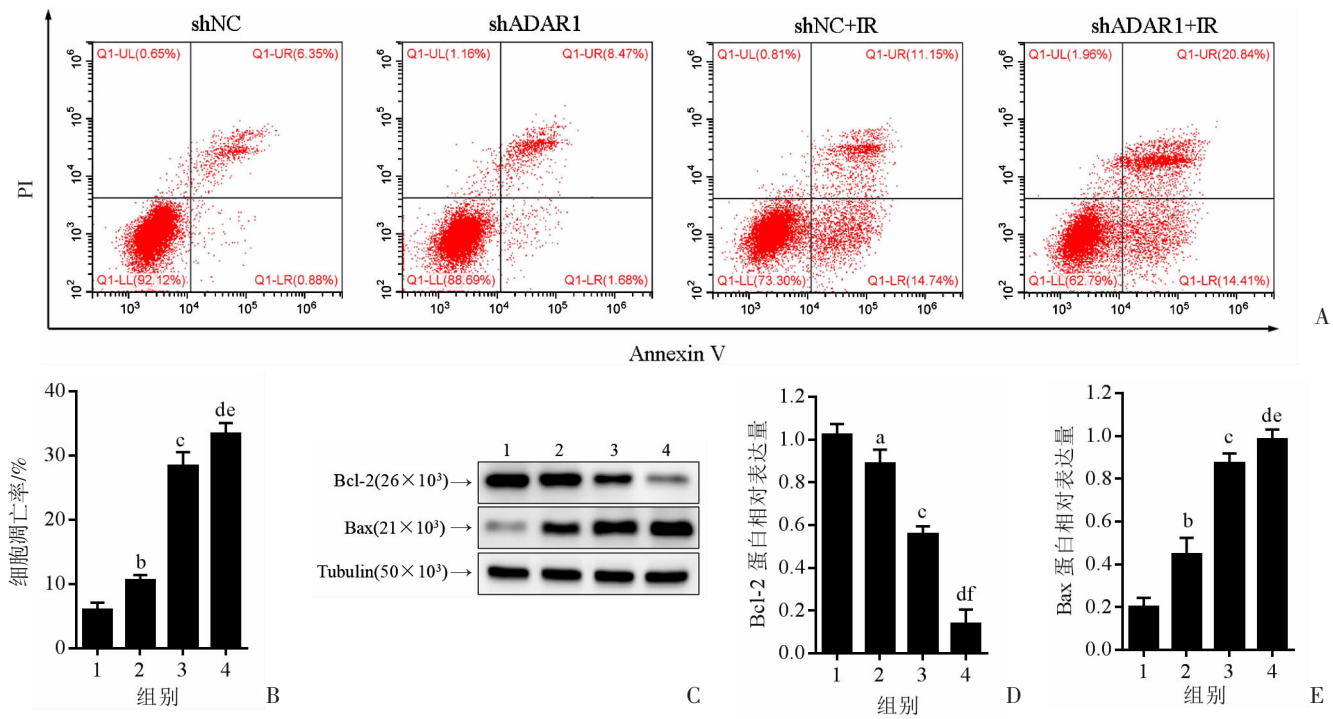
2.6 下调 ADAR1 联合 IR 协同抑制异种移植小鼠模型中的肿瘤生长

将 A549 shNC 和 A549 shADAR1 细胞皮下注射在裸鼠中,并且在第 10 d 给予 6 Gy X 射线照射肿瘤,每 3 d 测量体积直至处死小鼠。如图 6 所示,与 A549 shNC 比较,经 IR 后 A549 shADAR1 组的肿瘤生长明显受到抑制,表现为肿瘤大小、体积和重量均明显减少。



A:克隆形成实验检测在不同剂量 X 射线照射后细胞克隆形成数量;B:多靶单击模型拟合生存曲线图

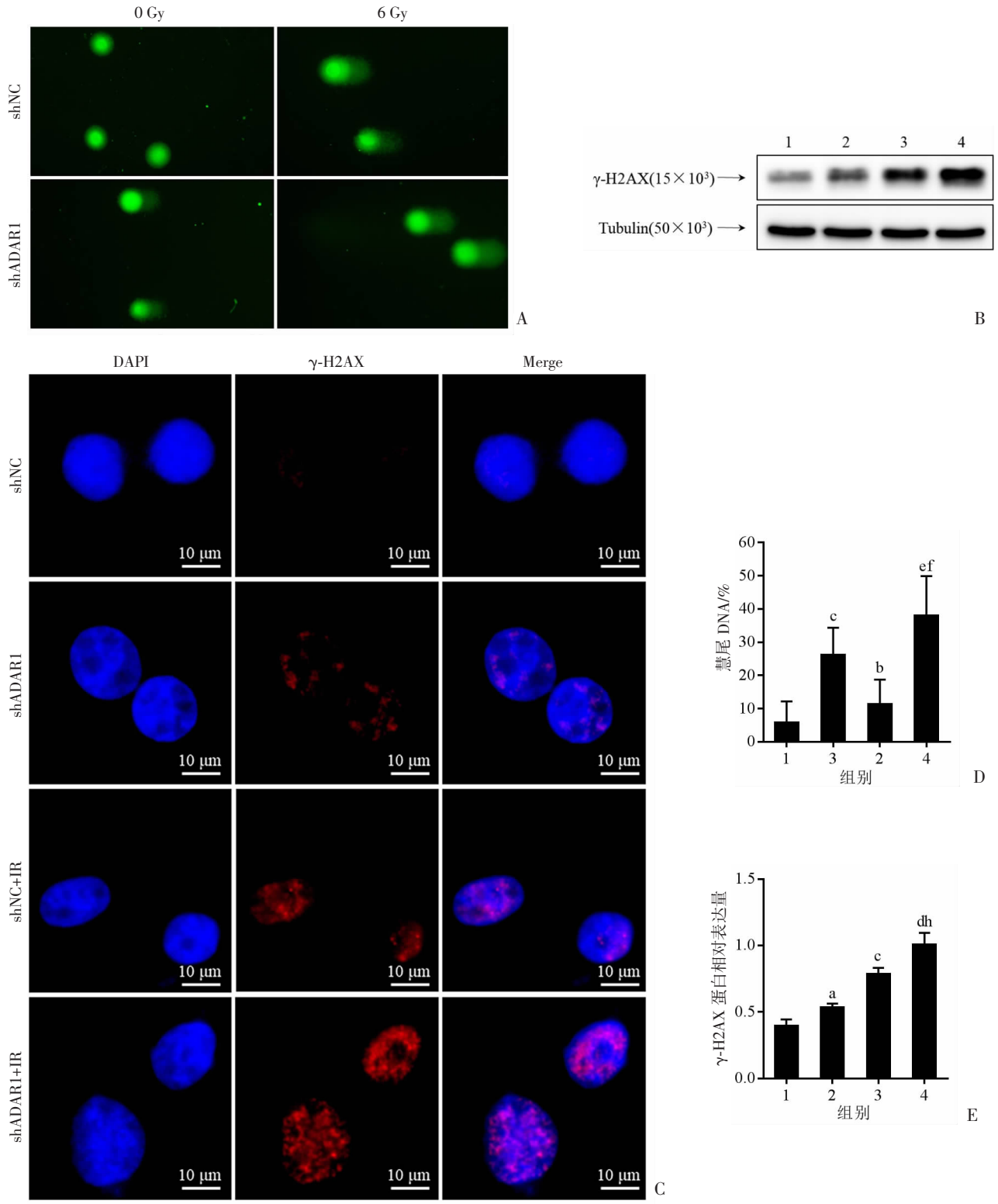
图 3 下调 ADAR1 增加 A549 细胞放射敏感性



1:shNC 组;2:shADAR1 组;3:shNC+IR 组;4:shADAR1+IR 组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 shNC 组比较;d:$P<0.001$,与 shADAR1 组比较;e:$P<0.05$,f:$P<0.01$,与 shNC+IR 组比较

A、B:IR 处理 24 h 后各组 A549 细胞 Annexin V/PI 流式细胞术分析结果;C:IR 处理 24 h 后各组 A549 细胞蛋白免疫印迹检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平;D、E:Bcl-2、Bax 蛋白表达的定量分析

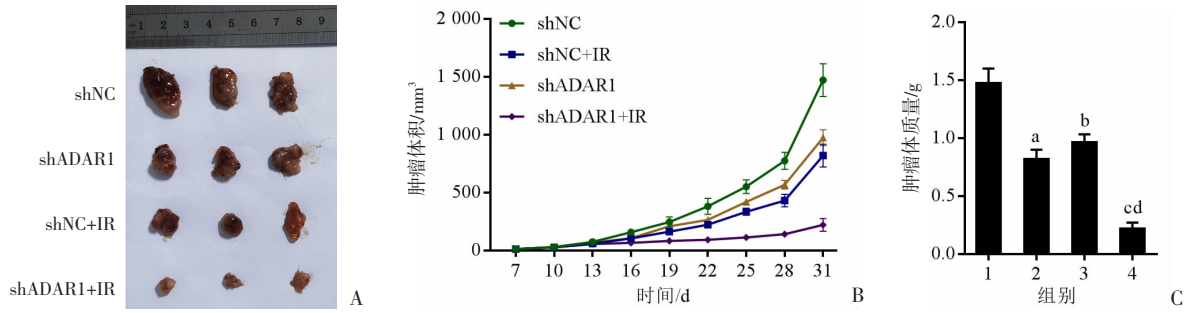
图 4 下调 ADAR1 增加 IR 后 A549 细胞凋亡 ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)



1:shNC 组; 2:shADAR1 组; 3:shNC+IR 组; 4:shADAR1+IR 组; a:$P<0.05$,与 shNC 组比较; b:$P<0.01$,与 shNC 组比较; c:$P<0.001$,与 shNC 组比较;d:$P<0.05$,与 shNC+IR 组比较;e:$P<0.01$,与 shNC+IR 组比较;f:$P<0.01$,与 shADAR1 组比较;h:$P<0.001$,与 shADAR1 组比较

A:IR 处理后 2 h 进行碱性彗星实验分析 A549 细胞的 DNA 损伤;B:蛋白免疫印迹实验检测 IR 处理后 2 h 测量 A549 细胞的 γ-H2AX 蛋白的表达水平;C:IR 处理后 2 h 对 A549 细胞行 γ-H2AX 免疫荧光染色　红色:示 γ-H2AX;蓝色:示 DAPI。D:示 DNA 损伤定量分析。E:示 A549 细胞 γ-H2AX 蛋白表达的定量分析

图 5　下调 ADAR1 增强 IR 后 A549 细胞 DNA 损伤　($\bar{x}\pm s, n=3$)



1:shNC 组;2:shNC+IR 组;3:shADAR1 组;4:shADAR1+IR 组; a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 shNC 组比较;c:$P<0.01$,与 shNC+IR 组比较;d:$P<0.001$,与 shADAR1 组比较

A:异种移植瘤的大体观察;B:肿瘤体积;C:肿瘤体质量

图 6 下调 ADAR1 抑制 IR 后 A549 细胞异种移植小鼠模型中肿瘤生长 ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

3 讨论

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,LUAD 是肺癌中最主要的病理类型,因其早期无明显临床症状,确诊时多为晚期,预后及生存率差[4]。放射治疗作为晚期肺癌患者的重要治疗手段,但与小细胞肺癌比较,放射治疗对 LUAD 的效果较差[5]。尽管由于过去几十年来放疗相关技术的不断改进,包括三维适形放疗、质子和重离子放疗,使这些技术的靶向准确性和有效性不断提高[17-18]。然而,肺腺癌细胞的放射敏感性较差,放射治疗最终会导致肿瘤细胞产生放射抗性,从而治疗失败或肿瘤复发。因此,寻求增加肺腺癌细胞放射敏感性的作用靶点具有重要的临床意义。

3.1 ADAR1 参与抑制辐照下肺腺癌细胞增殖和迁移并促进细胞凋亡

RNA 的稳定性、RNA 与蛋白质之间的相互作用以及蛋白质的正确翻译是推动正常细胞向恶性肿瘤转变的重要因素。ADAR1 作为一种重要的 RNA 编辑酶,其介导的 RNA 编辑对哺乳动物的生存至关重要。ADAR1 在 NSCLC 中 mRNA 和蛋白水平均存在过表达,且这种现象在 LUAD 中更为突出[12]。有研究表明,ADAR1 过度编辑的 AZIN1 RNA 可增加 LUAD 细胞的迁移、黏附能力[19]。ADAR1 介导的 RNA 编辑可激活 FAK 促进 LUAD 细胞增殖、迁移、侵袭[20]。同时,ADAR1 也被证实具有不依赖于 RNA 编辑的作用。在黑色素瘤中,ADAR1 通过调控 ITGB3 从而促进黑色素瘤的生长和侵袭[21]。此外,有研究表明,IR 可显著抑制 ADAR1 缺失的肿瘤细胞在动物体内生长[13]。本研究通过慢病毒转染肺腺癌 A549 细胞,构建低表达 ADAR1 基因的细胞株。研究发现,下调 ADAR1 可抑制 A549 细胞的增殖、迁移,予以 IR 后,两组细胞间的差异更加明显。说明下调 ADAR1 后 A549 细胞对放射性的敏感性增高。同时通过细胞克隆实验测量集落形成,我们验证了下调 ADAR1 使 A549 细胞对辐射更加敏感。Bax 和 Bcl-2 是 Bcl-2 家族中最具代表性的促进凋亡和抑制凋亡蛋白,它们在调控肿瘤细胞凋亡方面发挥着重要作用[22]。本研究结果表明,下调 ADAR1 可增加 IR 后 A549 细胞的凋亡率,同时 Bax 蛋白表达增加、BCL-2 蛋白表达下降,提示下调 ADAR1 可促进 IR 后 A549 细胞凋亡,增加放射敏感性。上述实验结果表明,下调 ADAR1 联合 IR 可以进一步抑制肺腺癌细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡,增加细胞放射敏感性,为 ADAR1 可能成为肺腺癌放射增敏的作用靶点提供了新思路。

3.2 ADAR1 通过参与 DNA 损伤修复调控肺腺癌细胞放射敏感性

有研究表明,在下调 ADAR1 的乳腺癌细胞中,DNA 损伤应答减少[23]。因此,我们推测 ADAR1 可能参与 IR 后细胞 DNA 损伤,从而影响细胞的放射敏感性。IR 诱导的 DNA 损伤主要包括碱基和糖损伤、单链断裂、双链断裂、成簇 DNA 损伤和共价链内或链间交联,其中 DSB 被认为是细胞对 IR 死亡的主要机制[24]。γ-H2AX 是 DBS 标志物,与肿瘤放射敏感性呈正相关[16]。我们的研究结果表明,shADAR1+IR 组细胞受到更严重的 DNA 损伤,γ-H2AX 表达量更高,提示我们下调 ADAR1 联合 IR 可通过诱导 DSB 而增加肺腺癌细胞的 DNA 损伤。在体内实验中,shADAR1+IR 组肿瘤的生长同样受到明显的抑制。上述实验结果表明,下调 ADAR1 增强 A549 细胞放射敏感性可能与 IR 后 DSB 增加所致 DNA 损伤有关,而参与 DSB 信号传导和修复的途径对于保护基因组稳定性和放射治疗的结果至关重要[25],为我们后续研究提供了思路。

综上所述,下调 ADAR1 可显著抑制电离辐射后肺腺癌细胞的增殖、迁移,促进细胞凋亡及 DNA 损伤,从而增加肺腺癌细胞的放射敏感性。因此,ADAR1 可能是肺腺癌放射增敏的靶点,但 ADAR1 参与肺腺癌放射增敏的具体分子机制仍有待深入研究,本研究旨在为这些前景提供理论依据。

参考文献:

[1] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454. DOI: 10.1038/nature25183.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[3] SCHABATH M B, COTE M L. Cancer progress and priorities: lung cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(10): 1563-1579. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.

[4] WANG M N, HERBST R S, BOSHOFF C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer[J]. Nat Med, 2021, 27(8): 1345-1356. DOI: 10.1038/s41591-021-01450-2.

[5] WU M, LIU J, HU C F, *et al*. Olaparib nanoparticles potentiated radiosensitization effects on lung cancer[J]. Int J Nanomed, 2018, 13: 8461-8472. DOI: 10.2147/ijn.s181546.

[6] BAKER A R, SLACK F J. ADAR1 and its implications in cancer development and treatment[J]. Trends Genet, 2022, 38(8): 821-830. DOI: 10.1016/j.tig.2022.03.013.

[7] LIU J Z, WANG F, ZHANG Y D, *et al*. ADAR1-mediated RNA editing and its role in cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 956649. DOI: 10.3389/fcell.2022.956649.

[8] ANADÓN C, GUIL S, SIMÓ-RIUDALBAS L, *et al*. Gene amplification-associated overexpression of the RNA editing enzyme ADAR1 enhances human lung tumorigenesis[J]. Oncogene, 2016, 35(33): 4407-4413. DOI: 10.1038/onc.2015.469.

[9] KIM H S, NA M J, SON K H, *et al*. ADAR1-dependent miR-3144-3p editing simultaneously induces MSI2 expression and suppresses SLC38A4 expression in liver cancer[J]. Exp Mol Med, 2023, 55(1): 95-107. DOI: 10.1038/s12276-022-00916-8.

[10] JIANG A, REECE D, CHANG H. Genomic stratification of multiple myeloma treated with novel agents[J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(2): 202-207. DOI: 10.3109/10428194.2011.608449.

[11] QIN Y R, QIAO J J, CHAN T H M, *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.

[12] YANG W D, CHEN K H, YU Q, *et al*. ADAR1 is a prognostic biomarker and is correlated with immune infiltration in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Med, 2023, 12(13): 14820-14832. DOI: 10.1002/cam4.6044.

[13] ISHIZUKA J J, MANGUSO R T, CHERUIYOT C K, *et al*. Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade[J]. Nature, 2019, 565(7737): 43-48. DOI: 10.1038/s41586-018-0768-9.

[14] ZHANG B, LI Y, ZHANG J Y, *et al*. ADAR1 links R-loop homeostasis to ATR activation in replication stress response[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(21): 11668-11687. DOI: 10.1093/nar/gkad839.

[15] SHIROMOTO Y, SAKURAI M, MINAKUCHI M, *et al*. ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1654. DOI: 10.1038/s41467-021-21921-x.

[16] SAKATA K I, SOMEYA M, MATSUMOTO Y, *et al*. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity[J]. Radiat Med, 2007, 25(9): 433-438. DOI: 10.1007/s11604-007-0161-3.

[17] POMPOS A, DURANTE M, CHOY H. Heavy ions in cancer therapy[J]. JAMA Oncol, 2016, 2(12): 1539-1540. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2646.

[18] MACCHIA G, FERRO M, CILLA S, *et al*. Efficacy and safety of 3D-conformal half body irradiation in patients with multiple bone metastases[J]. Clin Exp Metastasis, 2018, 35(8): 747-752. DOI: 10.1007/s10585-018-9939-1.

[19] HU X D, CHEN J Y, SHI X S, *et al*. RNA editing of AZIN1 induces the malignant progression of non-small-cell lung cancers[J]. Tumour Biol, 2017, 39(8): 1010428317700001. DOI: 10.1177/1010428317700001.

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

[21] ORGAZ J L, SANZ-MORENO V. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2013, 26(1): 39-57. DOI: 10.1111/pcmr.12041.

[22] WARREN C F A, WONG-BROWN M W, BOWDEN N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 177. DOI: 10.1038/s41419-019-1407-6.

[23] SAGREDO E A, SAGREDO A I, BLANCO A, *et al*. ADAR1 Transcriptome editing promotes breast cancer progression through the regulation of cell cycle and DNA damage response[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2020, 1867(8): 118716. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118716.

[24] SAGE E, SHIKAZONO N. Radiation-induced clustered DNA lesions: repair and mutagenesis[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 107: 125-135. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008.

[25] GACHECHILADZE M, SKARDA J, SOLTERMANN A, *et al*. RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies[J]. Int J Cancer, 2017, 141(7): 1286-1294. DOI: 10.1002/ijc.30764.

(收稿:2023-09-11;修回:2023-11-03)

(编辑 栾 嘉)