

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.008

ADAR1 shRNA 对人胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响 *

刘藻滨 蒋晓帆 张 磊 饶 维 杨悦凡 戴舒惠 陈 涛

李三中 罗 鹏 李 娟 费 舟[△]

(第四军医大学西京医院神经外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 ADAR1 shRNA 对人胶质瘤细胞 U87 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**通过构建 ADAR1-shRNA 的干扰质粒,经脂质体法转染胶质瘤 U87 细胞系,通过荧光倒置显微镜观察转染效率,选择转染效率最高的细胞系。取转染 48h 细胞,采用 RT-PCR 和 Western-blot 分别检测 ADAR1 mRNA 及蛋白的表达,流式细胞仪检测其细胞凋亡率,MTT 法检测细胞增殖情况。**结果:**①经 ADAR1-shRNA 转染 48h 后的转染效率最高,此时 U87 细胞系中 ADAR1 mRNA 及蛋白的表达均被显著抑制,较阴性对照组及空白组均明显降低($P<0.05$)。②在转染 ADAR1-shRNA 后,细胞凋亡率为 $(28.14\% \pm 3.76\%)$,明显高于阴性对照组 $(3.20\% \pm 1.57\%)$ 和空白组 $(2.80\% \pm 1.49\%)$,细胞增殖率较阴性对照组及空白组明显下降($P<0.05$)。**结论:**通过 shRNA 抑制 ADAR1 的表达能明显促进人胶质瘤细胞 U87 细胞的凋亡和抑制其增殖,ADAR1 基因可能成为治疗胶质瘤的新靶点。

关键词:ADAR1;胶质瘤;增殖;凋亡

中图分类号:R739.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3232-04

Effects of shRNA-ADAR1 on the Proliferation and Apoptosis of U87 Glioma Cell*

LIU Zao-bin, JIANG Xiao-fan, ZHANG Lei, RAO Wei, YANG Yue-fan, DAI Shu-hui, CHEN Tao,

LI San-zhong, LUO Peng, LI Juan, FEI Zhou[△]

(Department of neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: This study was designed to investigate the effects of transfection with small hairpin RNA (shRNA)-ADAR1 on the proliferation and apoptosis of human glioma U87 cell line. **Methods:** The shRNA expression vector which expresses the specific shRNA targeting ADAR1 mRNA (ADAR1-shRNA) or independent sequence (Negative-shRNA) was transfected into U87 cells, and then the U87 cells with stable expression of shRNA were selected. The expressions of ADAR1 were detected by RT-PCR and Western blotting. The cellular proliferation activity, and the apoptotic rate were determined by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results:** Compared with the Negative-shRNA group and the non-transfection group, the mRNA and protein expression levels of ADAR1 in U87 cells with transfection of ADAR1-shRNA (interference group) was significantly suppressed and the cell proliferation was slowed down after transfection for 48h ($P<0.05$). The apoptotic rate in the interference group ($28.14\% \pm 3.76\%$) was significantly higher than those in the Negative-shRNA group ($3.20\% \pm 1.57\%$) and the non-transfection group ($2.80\% \pm 1.49\%$) ($P<0.05$). The proliferation ratio of U87 cells significantly decreased after transfection of ADAR1 shRNA ($P<0.05$). **Conclusion:** ADAR1-shRNA transfection increases the apoptotic rate, inhibits the proliferation of U87 glioma cells, which provides a potential target in gene therapy for glioma.

Key words: ADAR1; Glioma; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3232-04

前言

胶质瘤是指由神经上皮组织衍化的肿瘤,是颅内最常见的恶性肿瘤^[1]。目前治疗方法包括手术、化学治疗、放射治疗等,但胶质瘤患者的中位生存期很少超过 15 个月^[2]。研究表明,这与肿瘤细胞的抗凋亡以及增殖能力较强有关^[3]。ADAR1 (又称 DSRAD) 是一种双链 RNA 编辑酶,位于 1 号染色体长臂上

(1q21.3)^[4],广泛存在于从原虫到哺乳动物体内。相关研究表明其与肿瘤的发生发展有密切关联^[5]。本研究通过探讨 ADAR1 在胶质瘤细胞系 U87 中的表达,以及 ADAR1 对其增殖和凋亡的影响,旨在为胶质瘤的诊治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和试剂

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30930093;81071034)

作者简介:刘藻滨(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:电话:029-84775330, E-mail: lazyboylzb@163.com

△ 通讯作者:费舟,电话:029-84775323, E-mail: feizhou@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-04 接受日期:2013-11-30)

实验使用 U87 胶质瘤细胞系由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库所提供。杜伯改良的依格培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium essential medium, DMEM)和胰蛋白酶由 Gibco 公司提供, 新生小牛血清由杭州四季青公司提供; ADAR1 抗体购自于美国 Abcam 公司, β -actin 抗体和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒由北京博奥森公司提供; 质粒中提取试剂盒由北京康为世纪生物公司提供; shRNA 购自于 Genecopoeia 公司 (产品货号为 HSH000471), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 由 Sigma 公司提供; Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 其余试剂为国产分析纯; 超净工作台为苏州净化设备厂产品, 蛋白电泳设备装置为美国 Bio-Red 公司生产。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 胶质瘤细胞系培养 在 U87 细胞系中加入 4 mL 含有 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 3 天进行传代一次, 实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 shRNA 转染与筛选 取对数生长期胶质瘤细胞 U87 接种于 24 孔培养板, 用含有 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液培养, 待细胞融合达到 70%-80% 时进行转染。实验共分 3 组, ADAR1-shRNA 干扰组、Negative-shRNA 干扰组 (阴性对照组) 和未转染组 (空白组)。将 eGFP-HIVU6-ADAR1-shRNA 和 eGFP-HIVU6-negative-shRNA 质粒用 Lipofectamine 2000 按说明书要求进行转染, 于转染后 24、48 及 72 h 后通过倒置荧光显微镜观察转染效率。

1.2.3 RT-PCR 检测 ADAR1 的表达 收集转染 48 h 后的 U87 细胞, 将细胞裂解液转移至 1.5 mL 管中, 加入 0.3 mL 氯仿混匀并高速离心 (12000 rpm) 15 min, 将水相转移至新 EP 管, 加入等体积异丙醇, 振荡混匀, 高速离心 (12000 rpm) 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇振荡后离心 (9000 rpm) 5 min 弃上清, 室温下干燥 DEPC 水 25 μ L 检测纯度后保存于 -70℃。按照试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。ADAR1(NM_001025107) 引物序列有 Primer 6.0 软件设计, 其正义链引物序列为: 5'-GCAACTCCACATCTGCCTTG-3'; 反义链引物序列: 5'-GACCTACCTCTCTCACACCCT-3'; 产物长度为 2899 bp, 以 GAPDH 作为内参, 其正义链引物序列为: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; 反义链引物序列 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; 产物长度为 138 bp。扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s; ADAR1, GAPDH 均以 56℃ 退火 45 s, 70℃ 延伸 30 s, 25 个循环; 70℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.8% 的糖凝胶电泳分离, 采用凝胶成像仪分析并照相, 比较灰度值, 每个样本至少重复 5 次。

1.2.4 Western-blot 检测 U87ADAR1 的表达 对进行不同处理的 U87 细胞系分别在生长对数期进行收集, 用蛋白酶裂解液裂解细胞, 并提取蛋白。加入 2 $\times$ 凝胶上样缓冲液, 并于沸水中煮 5 min。通过 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。再对定量后的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压依次为浓缩胶 110V, 分离胶 130V。采用半干法以恒流 100 mA, 2 h 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上; 将硝酸纤维素膜浸于蛋白封闭液 (1.5g 脱脂奶粉溶于 30 mL 磷酸盐吐温缓冲液中) 中, 室温 25℃ 封闭 1 h; 加入以磷酸盐吐温缓冲液按 500:1 稀释的兔抗人 ADAR1 一抗, 4℃ 过夜。用磷酸盐吐温缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入

1:20000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温放置 1 h, 磷酸盐吐温缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入发光液浸泡硝酸纤维素膜 5 min; 用凝胶成像仪成像。每个试验样品至少重复 5 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 于转染成功 48 h 后, 细胞密度调整至 1×10^6 mL, 加入 RNA 酶, 水浴 37℃, 时间 30 min, 再加入碘化吡啶 (PI) 和 AV, 双染避光染色 30 min 后, 在网膜过滤后进行检测。根据 DNA 直方图中 G1 峰前出现的亚二倍峰, 计算凋亡率 (apoptotic index (AI), 即凋亡细胞所占百分比)。实验至少重复 5 次。

1.2.6 MTT 检测细胞增殖 取对数生长期细胞, 细胞浓度调整至 1×10^6 个 / mL, 接种于 24 孔板。转染后分别在含有 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液中培养 24、48、72 和 96 h, 每孔细胞中加入 MTT (5 g/L) 60 μ L, 继续孵育 4 h 后, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 200 μ L 孔, 避光震荡 10 min 后, 用波长 492 nm 的酶联检测仪检测吸光度值, 每组 6 孔。计算细胞增殖率 = [实验组平均吸光度值 / 空白组平均吸光度值 $\times$ 100%]。实验至少重复 5 次。

1.3 统计学分析

数据处理用 SPSS16.0 软件, 各组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 两组间均数比较用 t 检验, 多组均数间的显著性检验用方差分析, 以 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADAR1 shRNA 转染 U87 细胞后的荧光观察结果

通过倒置荧光显微镜分别于转染细胞 24、48 和 72 h 后进行观察, 发现转染 48 h 时, ADAR1-shRNA 的转染效率最高, 转染 72 h 后绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达逐渐衰减, 并发现大量细胞死亡。因此, 选择在对细胞转染 48 h 时进行 ADAR1 mRNA 和蛋白表达进行检测。(图 1A)

2.2 转染 48 h 后细胞中 ADAR1 mRNA 及蛋白的表达

对 ADAR1-shRNA 转染 48 h 的细胞进行 RT-PCR 检测, 结果显示 ADAR1-shRNA 干扰组 ADAR1 mRNA 的表达水平明显低于阴性对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1B)。Western-blot 检测的结果显示: ADAR1-shRNA 干扰组中 ADAR1 蛋白 (P110 和 P150) 的表达水平明显低于阴性对照组和空白组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1C、D)

2.3 ADAR1 shRNA 对 U87 细胞增殖的影响

经 ADAR1 shRNA 转染 24、48、72 和 96 h 后, ADAR1-shRNA 干扰组与 Negative-shRNA 干扰组及空白对照组相比细胞生长增殖率明显下降, 差异有明显统计学意义 ($P < 0.05$)。(图 2A)

2.4 ADAR1 shRNA 对 U87 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测细胞凋亡, 结果显示 ADAR1 shRNA 转染 U87 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率为 (28.14 $\pm$ 3.76%), 明显高于阴性对照组 (3.20 $\pm$ 1.57%) 和空白对照组 (2.80 $\pm$ 1.49%), 差异均有统计学意义 (图 2B)。

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统发病率最高的恶性肿瘤之一, 其具体的发病机制目前尚不清楚^[9], 可能与多种外源性和内源性的

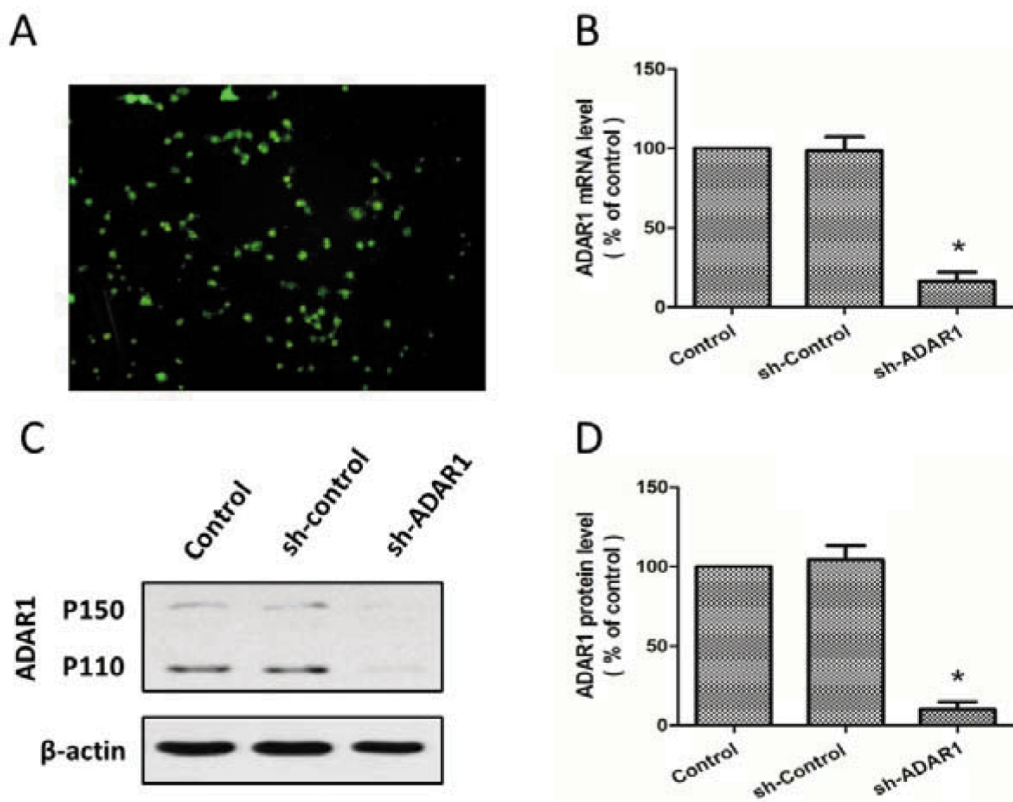


图 1A ADAR1-shRNA 质粒转染 U87 细胞 48h 后可见大量绿色荧光细胞(200 $\times$)

Fig. 1A A lot of green fluorescence was observed in U87 cells transfected with ADAR1-shRNA after 48 h (200 $\times$)

图 1B RT-PCR 检测转染 48h 后细胞中 ADAR1 mRNA 的表达

Fig. 1B Expressions of ADAR1 mRNA in U87 cells transfected with ADAR1-shRNA detected by RT-PCR

图 1C&D Western-blot 检测转染 48h 后细胞中 ADAR1 蛋白的表达

Fig. 1C&D Expressions of ADAR1 protein in U87 cells transfected with ADAR1-shRNA detected by Western-blot

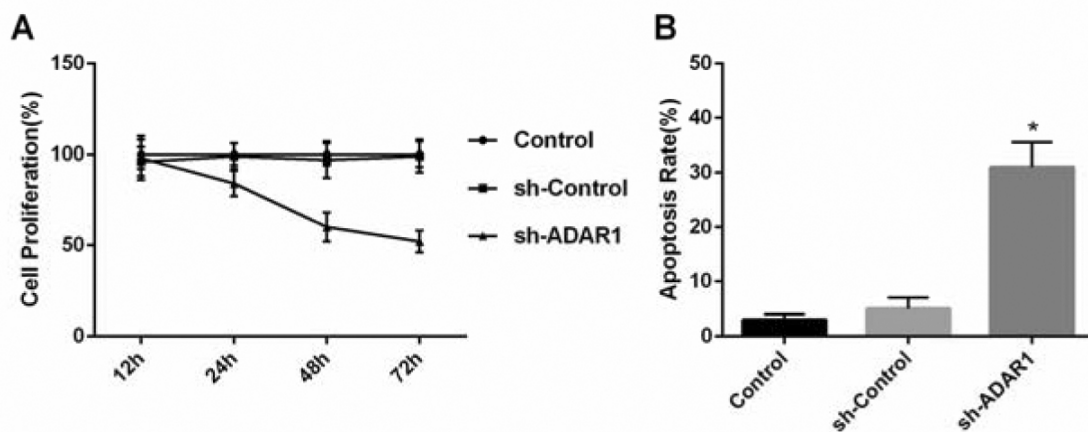


图 2A ADAR1-shRNA 对 U87 细胞增殖的影响

Fig. 2A Effect of ADAR1-shRNA on the proliferation of U87 cells

图 2B ADAR1-shRNA 对 U87 细胞凋亡的影响

Fig. 2B Effect of ADAR1-shRNA on the apoptosis of U87 cells

因子共同作用有关^[7]。研究显示,DNA 突变为许多癌症的发生发展提供了重要的分子线索^[8],特别是转录后的调控事件,如 RNA 编辑,正在成为研究包括人类肿瘤等多种疾病的新方向^[9]。

ADARs 酶家族能够通过转录后产生的目标 RNA 序列进行将腺嘌呤脱氨基的作用,使腺嘌呤转化为次黄嘌呤,影响翻译中碱基的配对,从而完成对 RNA 的编辑^[10]。目前关于 RNA 编辑与胶质瘤的研究多集中于 ADAR2^[11,12]。相关研究认为 ADAR2 与胶质瘤细胞的增殖和侵袭性密切相关。ADAR2 可以

通过作用于离子型谷氨酸受体(AMPA 亚型)mRNA 的 Q/R 位点,进而改变 AMPAR 对 Ca^{2+} 的通透性,使细胞质内 Ca^{2+} 浓度降低,从而抑制肿瘤的增殖^[13,14]。Caterina 等在研究检测 ADAR2 在儿童胶质母细胞瘤上的表达时,发现由于选择性的拼接错误,导致 ADAR1 在儿童胶质瘤细胞的表达较正常脑组织明显升高^[15]。而相关研究认为,胶质瘤中高表达的 ADAR1,通过与 ADAR2 形成异二聚体,而影响了 ADAR2 同二聚体的形成^[16-18],从而影响 ADAR2 对 AMPAR mRNA 的编辑,进而抑制细胞的

增殖与侵袭^[9]。

本实验的结果显示,通过 ADAR1-shRNA 干扰胶质瘤 U87 细胞后,使细胞内 ADAR1(P110)的表达明显下降,且细胞增殖明显下降,细胞凋亡明显增多,表明 ADAR1 有促进胶质瘤细胞增殖以及抑制其凋亡的能力,但其发挥作用的具体途径是与 ADAR2 形成的异二聚体相关,或是与 ADAR1 通过干预 miRNA 的合成^[20],尚待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明通过 shRNA 抑制 ADAR1 的表达能明显促进人胶质瘤细胞 U87 细胞的凋亡并抑制其增殖,ADAR1 基因可能成为治疗治疗胶质瘤的新靶点,针对 ADAR1 基因的干涉技术有望成为胶质瘤基因治疗的新途径。

参考文献(References)

- [1] Deorah, S. et al, Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001 [J]. Neurosurg Focus, 2006, 20(4): E1
- [2] Dolecek, T.A., et al., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009 [J]. Neuro Oncol, 2012,14 Suppl 5: 1-49
- [3] Ricard, D, et al. Primary brain tumours in adults [J]. Lancet, 2012, 379 (9830): 1984-1996
- [4] Weier, H. U. et al. The interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) maps to human chromosome 1q21.1-21.2 [J]. Genomics, 1995, 30(2): 372-375
- [5] Reenan, R. A. Molecular determinants and guided evolution of species-specific RNA editing [J]. Nature, 2005, 434(7031): 409-413
- [6] Davis, F. G. et al. Issues of diagnostic review in brain tumor studies: from the Brain Tumor Epidemiology Consortium[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(3): 484-489
- [7] Gladson, C.L. R.A. Prayson, and W. M. Liu, The pathobiology of glioma tumors [J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 33-50
- [8] Hou, W.G. et al. Genetic variation in the EGFR gene and the risk of glioma in a Chinese Han population [J]. PLoS One, 2012, 7(5): 25
- [9] Keegan, L. P. A. Gallo, and M. A. O'Connell, The many roles of an RNA editor[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(11): 869-878
- [10] Ma, C.H. et al. Abnormal expression of ADAR1 isoforms in Chinese pediatric acute leukemias [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(2): 245-251
- [11] Galeano, F. et al. ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis [J]. Oncogene, 2013, 32(8): 998-1009
- [12] Tariq, A. et al. RNA-interacting proteins act as site-specific repressors of ADAR2-mediated RNA editing and fluctuate upon neuronal stimulation[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(4): 2581-2593
- [13] Tomaselli, S. et al. ADAR2 editing activity in newly diagnosed versus relapsed pediatric high-grade astrocytomas [J]. BMC Cancer, 2013,13(255): 1471-2407
- [14] Maas, S. et al. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (25): 14687-14692
- [15] Cenci, C. et al. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(11): 7251-7260
- [16] Schmauss, C. et al. The roles of phospholipase C activation and alternative ADAR1 and ADAR2 pre-mRNA splicing in modulating serotonin 2C-receptor editing in vivo[J]. Rna, 2010, 16(9): 1779-1785
- [17] Witman, N.M. et al. ADAR-Related Activation of Adenosine-to-Inosine RNA Editing During Regeneration [J]. Stem Cells Dev, 2013,22 (16): 2254-2267
- [18] Yang, Y. X. Zhou, and Y. Jin, ADAR-mediated RNA editing in non-coding RNA sequences [J]. Sci China Life Sci, 2013, 5: 5
- [19] Hideyama, T. et al. Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced activity of an RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons[J]. PLoS One, 2012,7(8): 20
- [20] Nishikura, K, et al. Antagonistic and stimulative roles of ADAR1 in RNA silencing: An editor's point-of-view [J]. RNA Biol, 2013, 10: 8

(上接第 3215 页)

Wang Yi-jia, Tang Tao, Cui Yu, et al. The diagnostic value of human cervical cancer oncogene in colon tumor [J]. China Oncology, 2010, 10:796-798

- [18] Zhang G, Ha SA, Kim HK, et al. Combined analysis of AFP and HCCR-1 as an useful serological marker for small hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study [J]. Dis Markers, 2012,32 (4): 265-271

- [19] 刘保才, 霍景瑞, 刘英富, 等. 肝癌候选标志物 HCCR 单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 10:1094-1097

+1102

Liu Bao-cai, Huo Jing-rui, Liu Ying-fu, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against HCCR protein [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2011, 27 (10):1094-1097

- [20] 周游, 吴峰, 范国才, 等. 基于 B 细胞表位制备抗肝细胞生长素的抗体[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(10):761-763
- Zhou You, Wu Feng, Fan Guo-cai, et al. Generation of antibody against hepatopietin based on B cell epitopes[J]. Letters In Biotechnology, 2009, 20(10):761-763