8-氯腺苷通过ADAR1调控miR-335-5p抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

张梨虹　涂增　谢凤　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　　该文探讨了8-氯腺苷(8-chloro-adenosine, 8-Cl-Ado)调控RNA编辑酶1(adenosine deaminases acting on RNA1, ADAR1)对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 确定了ADAR1与miR-335-5p表达的相关性。10 μmol/L的8-Cl-Ado作用于乳腺癌细胞后(不同时间点), 采用CCK-8检测细胞的增殖情况; Transwell检测细胞的迁移和侵袭情况; Western blot检测ADAR1蛋白的表达水平; CCK-8检测ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞增殖的影响; Transwell检测ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响; miRNA芯片筛选8-Cl-Ado处理后乳腺癌细胞中上调的miRNA, qRT-PCR验证其与ADAR1的相关性。结果显示, 8-Cl-Ado能抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭; ADAR1蛋白的表达量随8-Cl-Ado处理时间的增加而逐渐降低; ADAR1的过表达能减弱8-Cl-Ado对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用; miR-335-5p经8-Cl-Ado处理后表达水平上调, 与ADAR1呈负向调控关系。以上结果表明, 8-Cl-Ado下调ADAR1抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与ADAR1下调miR-335-5p有关。

关键词　　乳腺癌; 8-氯腺苷; ADAR1; miR-335-5p; 增殖; 迁移; 侵袭

8-chloro-adenosine Inhibits Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by ADAR1-Regulated miR-335-5p

Zhang Lihong, Tu Zeng, Xie Feng, Yang Shengyong*, Li Li*

(*Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*)

Abstract　　The aim of this study was to investigate the effects of 8-chloro-adenosine (8-Cl-Ado) on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by regulating adenosine deaminases acting on RNA1 (ADAR1), and the correlation of expression between ADAR1 and miR-335-5p. After the treatment of breast cancer cells with 10 μmol/L of 8-Cl-Ado at different time points or overexpression of ADAR1 in the cells for 48 h, proliferation was examined by CCK-8 while migration and invasion were determined by Transwell, and the expression levels of ADAR1were measured by Western blot. Up-regulated miRNAs were screened by miRNA microarray and confirmed by qRT-PCR. The results showed that 8-Cl-Ado inhibited the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. The protein expression of ADAR1 gradually decreased in a time dependent manner. ADAR1 overexpression reduced the inhibition of proliferation, migration and invasion caused by 8-Cl-Ado. MiR-335-5p was high-

ly expressed after 8-Cl-Ado treatment, and it was negatively regulated by ADAR1. In summary, 8-Cl-Ado inhibits proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through down-regulating ADAR1, and its mechanism may relate to inhibition of miR-335-5p by ADAR1.

Keywords　　breast cancer; 8-Cl-Ado; ADAR1; miR-335-5p; proliferation; migration; invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率位列女性恶性肿瘤之首, 且年轻化趋势日益显著。目前, 尽管乳腺癌的诊断和治疗水平获得很大的提高, 但运用于临床的治疗药物仍存在毒性大、副作用多等缺点, 因此寻找高效低毒的抗肿瘤药物依旧是乳腺癌治疗研究的目标之一。腺苷、腺苷酸等衍生物在抗肿瘤药物中有着重要的地位, 8-氯腺苷(8-chloro-adenosine, 8-Cl-Ado)作为8-Cl-cAMP的代谢产物, 是腺苷类似物抗肿瘤药的一种, 目前处于治疗慢性淋巴细胞白血病临床I期试验阶段[1], 具有抑制肿瘤细胞增殖, 引起肿瘤细胞阻滞、自噬和诱导肿瘤细胞凋亡等作用[2-6]。本课题组前期发现, 8-Cl-Ado能抑制HER-2阳性乳腺癌细胞SK-BR-3的增殖和迁移[7], 但其在乳腺癌中的具体作用及机制尚不明确。

据报道, RNA编辑与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关[8-11]。RNA编辑酶(adenosine deaminases acting on RNA, ADARs)是一种作用于RNA的腺苷脱氨酶, 能够将特定位点的腺苷去氨基转化为次黄嘌呤, 即A-to-I RNA编辑。ADAR1是研究最为广泛的RNA编辑酶, 由于启动子的选择不同, 有p150和p110两种亚型。它能介导A-to-I RNA编辑, 编辑位点大多数发生在mRNA前体或mRNA非编码区和非编码RNA中。miRNA是一类长度为21~25个核苷酸的单链内源性非编码RNA, 其异常表达与大多数肿瘤的发病机制相关。有研究表明, ADAR1能够调控miRNA的表达, 影响肿瘤的发生发展[12]。ADAR1在乳腺癌中高表达[7], miR-335-5p在乳腺癌中低表达已被证实[13], 但ADAR1和miR-335-5p两者间的相关性及作用机制尚未有报道。

因此, 本研究旨在探讨8-Cl-Ado、ADAR1及miR-335-5p之间的相关性及其对三阴乳腺癌细胞MDA-MB-231和ER、PR阳性乳腺癌细胞MCF-7增殖、迁移和侵袭的影响, 结合前期研究, 全面探讨ADAR1与8-Cl-Ado的靶向调控关系, 进一步在ADAR1调控miRNA的靶向信号通路这一层面上, 为研究8-Cl-Ado的抗乳腺癌作用, 提供新的思路和方向。

1　材料与方法

1.1　材料

细胞、菌株及质粒: 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、MCF-7来源于重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心教研室; 感受态细胞DH5α购自天根生化科技有限公司; pCMV空载体、ADAR1-p150表达载体由匹兹堡大学医学中心王清德教授提供[14]。

1.2　主要试剂

无内毒素质粒小抽试剂盒购自美国Omega公司; RPMI-1640培养基购自美国Hyclone公司; PAN胎牛血清购自德国PAN-Biotech GmbH公司; 胰酶购自美国Gibco公司; 8-Cl-Ado购自德国Biolog公司; 兔抗人ADAR1抗体购自美国Abcam公司; ECL发光液购自美国Millipore公司; lipoFiter™脂质体转染试剂购自汉恒生物有限公司; Transwell基质胶购自美国BD生物科学有限公司; 染料法miRANs定量和*U6*校准qRT-PCR试剂盒购自上海吉玛有限公司; 山羊抗兔IgG、蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE蛋白凝胶电泳配胶试剂、蛋白上样缓冲液、CCK-8试剂盒和PBS等均购自碧云天生物技术有限公司。

1.3　细胞培养

在37 ℃、5% CO_2的饱和湿度孵箱中培养人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7, 培养基为含有10%血清的RPMI-1640培养基, 常规换液传代, 选择处于对数生长期的细胞进行后续实验。

1.4　质粒转染/加药处理

将处于对数生长期的MDA-MB-231、MCF-7细胞接种于6孔板, 分为对照/8-Cl-Ado组、pCMV/8-Cl-Ado组和ADAR1-p150/8-Cl-Ado组。转染pCMV、ADAR1-p150质粒至乳腺癌细胞, 转染试剂与质粒比例为6 μL:3 μg。8 h后换新鲜的10%血清培养基, 加药组在换新鲜培养基的同时加入10 μmol/L的8-Cl-Ado, 继续培养48 h, 此处理过程与分组为后续实验前提。本课题组前期发现, 在乳腺癌细胞MDA-MB-231中, 8-Cl-Ado的半抑制浓度(half maximal inhibitor y concentration, IC_{50})为9.482 μmol/L。加药48 h后, 细胞的增殖抑制率明显降低。结合国外相关研究[3,15],

暂定8-Cl-Ado的药物处理浓度为10 μmol/L。

1.5　CCK-8检测细胞生存率

将经过步骤1.4处理分组的乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7分别制成细胞悬液, 接种于96孔培养板, 每组设5个复孔, 每孔4 000个细胞/100 μL细胞悬液。培养48 h, 加入CCK-8, 每孔10 μL, 采用酶标仪测量D_{450}值, 实验重复3次。

1.6　Transwell检测细胞迁移、侵袭情况

将经过步骤1.4处理分组的乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7分别制成细胞悬液。迁移上室每孔接种$2×10^4$个细胞(200 μL RPMI-1640培养基), 下室均加入500 μL含10%的血清培养基, 培养24 h后取出Transwell小室, 吸弃上室液体, 用棉签擦除室壁细胞。4%多聚甲醛固定Transwell小室反面细胞20 min。结晶紫染色15 min, PBS轻柔洗去染液, 自然风干。200倍镜下观察并拍照, 随机选取3个视野计数, 取均数作为透膜细胞数, 实验重复3次。侵袭在迁移基础上铺8%基质胶, 并将细胞量调整为$5×10^4$个孔。

1.7　Western blot检测蛋白表达情况

根据不同实验要求, 收集细胞, 提取总蛋白并定量, 测定其浓度。取总蛋白40 μg进行SDS-PAGE电泳(80 V, 30 min; 120 V, 1.5 h); 电转(250 mA, 2.5 h)后, 放入5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 一抗β-actin(1:1 000)、ADAR1(1:1 000), 4 ℃过夜孵育; 二抗(1:3 000)室温摇床孵育1.5 h, 采用蛋白凝胶成像分析仪曝光, 重复实验3次。

1.8　miRNA芯片筛选高表达miRNA

将处于对数生长期的乳腺癌细胞MDA-MB-231接种于6孔板, 贴壁培养24 h后, 分为对照组和加药组, 加药组加入8-Cl-Ado(10 μmol/L), 培养72 h, 收集并送至上海康成生物公司检测并筛选8-Cl-Ado作用下乳腺癌中的高表达miRNA。

1.9　RNA提取和qRT-PCR检测miR-335-5p的表达水平

1 mL Trizol加入经过步骤1.4处理分组的细胞中, 重悬并反复吹打使细胞充分裂解, 加入200 μL氯仿, 剧烈振荡混匀30 s, 室温静置30 min, 4 ℃下12 000 r/min离心15 min。小心转移上层水相于另一无酶EP管中, 加入500 μL异丙醇轻柔地颠倒混匀, 室温静置10 min。4 ℃下12 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 加入1 mL 80%乙醇洗涤, 4 ℃下12 000 r/min离心5 min弃上清, 超净台下风干。加入20 μL DEPC水溶解, 测定浓度。miR-335-5p的

逆转录引物序列为5′-UCA AGA GCA AUA ACG AAA AAU GUA UUU UUC GUU AUU GCU CUU GAU U-3′。使用染料法miRANs定量和*U6*校准qRT-PCR试剂盒进行反转录和PCR检测, *U6* RNA作为内参。每个样本重复3次, 通过比较CT值法($2^{-ΔΔC_t}$)进行相对定量分析。

1.10　统计学分析

采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 6.0软件对各实验结果进行统计学分析, 每个实验均重复3次。结果以均数±标准差(mean±S.D.)表示, 多组均数进行One-Way ANOVA检验和两组均数进行Student's *t*检验。$P<0.05$时, 具有统计学意义。

2　结果

2.1　8-Cl-Ado对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响
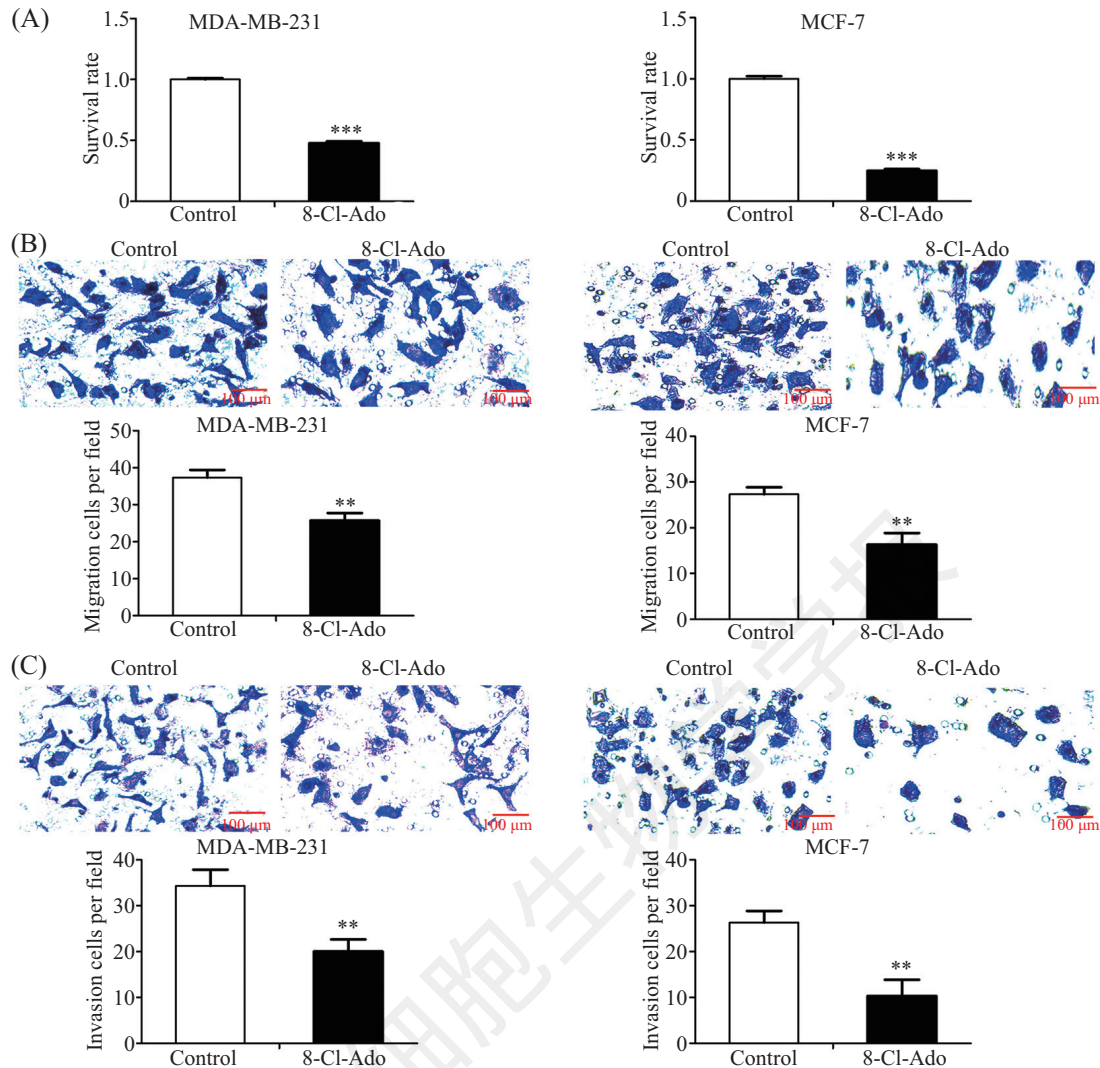
CCK-8、Transwell结果显示, 乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7接受8-Cl-Ado(10 μmol/L)处理48 h后, 与空白对照组相比, 加药组细胞生存率显著降低($P<0.001$, 图1A), 迁移和侵袭细胞数明显减少($P<0.01$, 图1B和图1C)。表明8-Cl-Ado能抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.2　8-Cl-Ado对乳腺癌细胞中ADAR1蛋白表达水平的影响

Western blot结果显示, 8-Cl-Ado(10 μmol/L)作用乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7不同时间(0、24、48、72 h), 细胞内ADAR1蛋白表达随着8-Cl-Ado作用时间的增加而逐渐下降(图2)。表明8-Cl-Ado下调乳腺癌中ADAR1蛋白的表达量。

2.3　ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

在乳腺癌细胞中过表达ADAR1-p150质粒后(图3A和图3B), CCK-8、Transwell结果显示, 与pCMV组细胞生存率、迁移和侵袭细胞数相比, ADAR1-p150组生存率明显升高($P<0.001$, 图3C), 迁移、侵袭细胞数显著增多($P<0.05$, 图4A和图4B)。表明ADAR1过表达促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。与pCMV+8-Cl-Ado组相比, ADAR1-p150+8-Cl-Ado组生存率明显上升($P<0.001$, 图3C), 迁移、侵袭细胞数有所增加($P<0.05$, 图4A和图4B)。表明ADAR1过表达能减弱8-Cl-Ado对乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7的增殖、迁移和侵袭的抑制作用。以上所有结果说明, ADAR1是8-Cl-Ado抗乳腺癌的作用靶点, 8-Cl-Ado

A: CCK-8检测8-Cl-Ado对乳腺癌细胞增殖的影响; B:Transwell检测8-Cl-Ado对乳腺癌细胞迁移的影响; C: Transwell检测8-Cl-Ado对乳腺癌细胞侵袭的影响。**$P<0.01$, ***$P<0.001$, 与对照组比较。

A: the effect of 8-Cl-Ado on the proliferation of breast cancer cells were examined by CCK-8; B: the effect of 8-Cl-Ado on the migration of breast cancer cells were determined by Transwell; C: the effect of 8-Cl-Ado on the invasion of breast cancer cells were measured by Transwell. **$P<0.01$, ***$P<0.001$ compared with the control group.
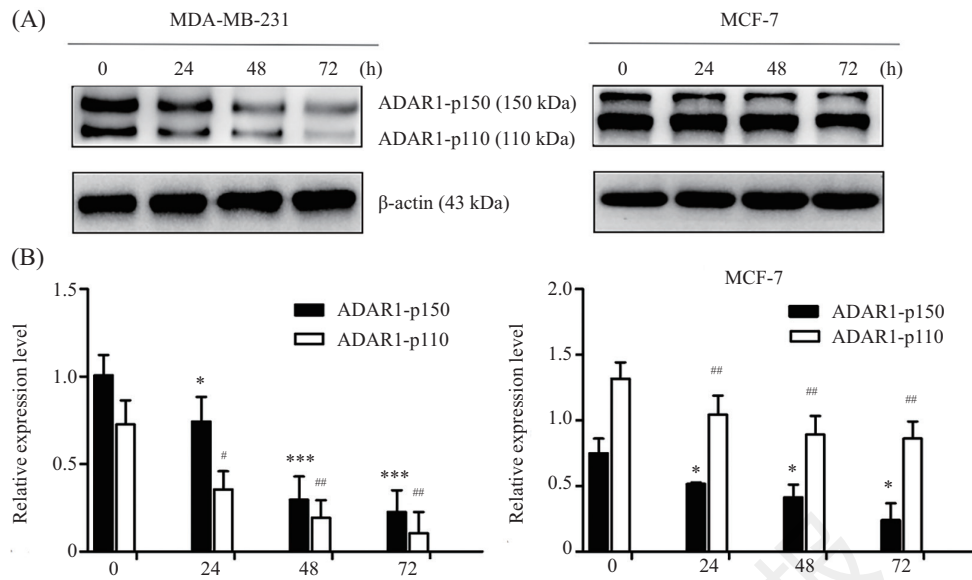
图1 8-Cl-Ado对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.1 Effects of 8-Cl-Ado on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells

通过下调ADAR1抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.4 miRNA芯片筛选并验证与8-Cl-Ado下调ADAR1相关的miRNA

8-Cl-Ado处理乳腺癌细胞MDA-MB-231 72 h后, miRNA芯片结果显示, miR-335-5p、miR-4298等抑癌基因表达量上升, miR-1234-3p等促癌基因表达量下降。但经过qRT-PCR分析后发现, miR-335-5p的表达水平显著上升, 差异最为明显(图5A和图5B), 而miR-4298、miR-1234-3p的变化无统计学意

义。qRT-PCR结果显示, ADAR1-p150质粒过表达后, 8-Cl-Ado作用于乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7 48 h, 与control组相比, control+8-Cl-Ado组的miR-335-5p表达水平明显上升($P<0.001$)。与pCMV组相比, ADAR1-p150组的miR-335-5p表达水平有所下降($P<0.01$), 并且ADAR1-p150+8-Cl-Ado组的miR-335-5p表达水平明显低于pCMV+8-Cl-Ado组($P<0.001$, 图5B)。以上结果说明, 8-Cl-Ado可以显著上调miR-335-5p的表达水平, 而ADAR1能下调miR-
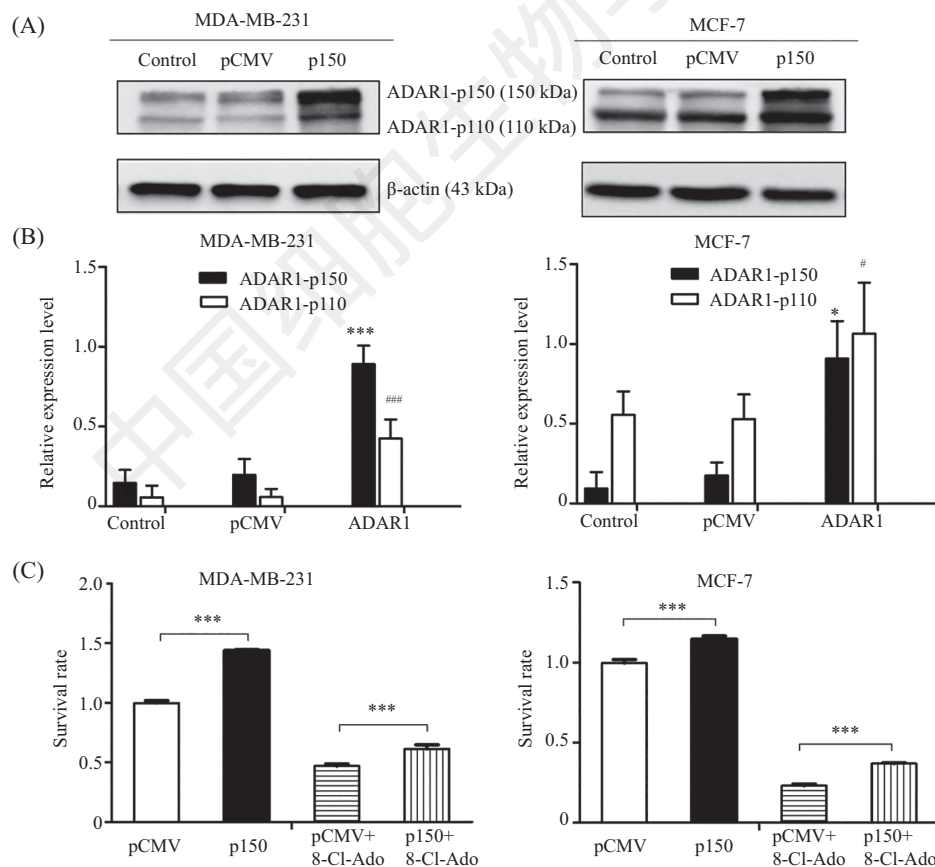
A: 8-Cl-Ado作用乳腺癌细胞后ADAR1蛋白表达情况; B: ADAR1蛋白定量分析; *$P<0.05$, ***$P<0.001$, #$P<0.05$, ##$P<0.01$, 与0 h组比较。

A: expression of ADAR1 protein in breast cancer cells treated with 8-Cl-Ado; B: quantitative analysis of ADAR1 protein; *$P<0.05$, ***$P<0.001$, #$P<0.05$, ##$P<0.01$ compared with the 0 h group.

图2 8-Cl-Ado对乳腺癌细胞中ADAR1蛋白表达水平的影响

Fig.2 Effect of 8-Cl-Ado on the expression of ADAR1 in breast cancer cells
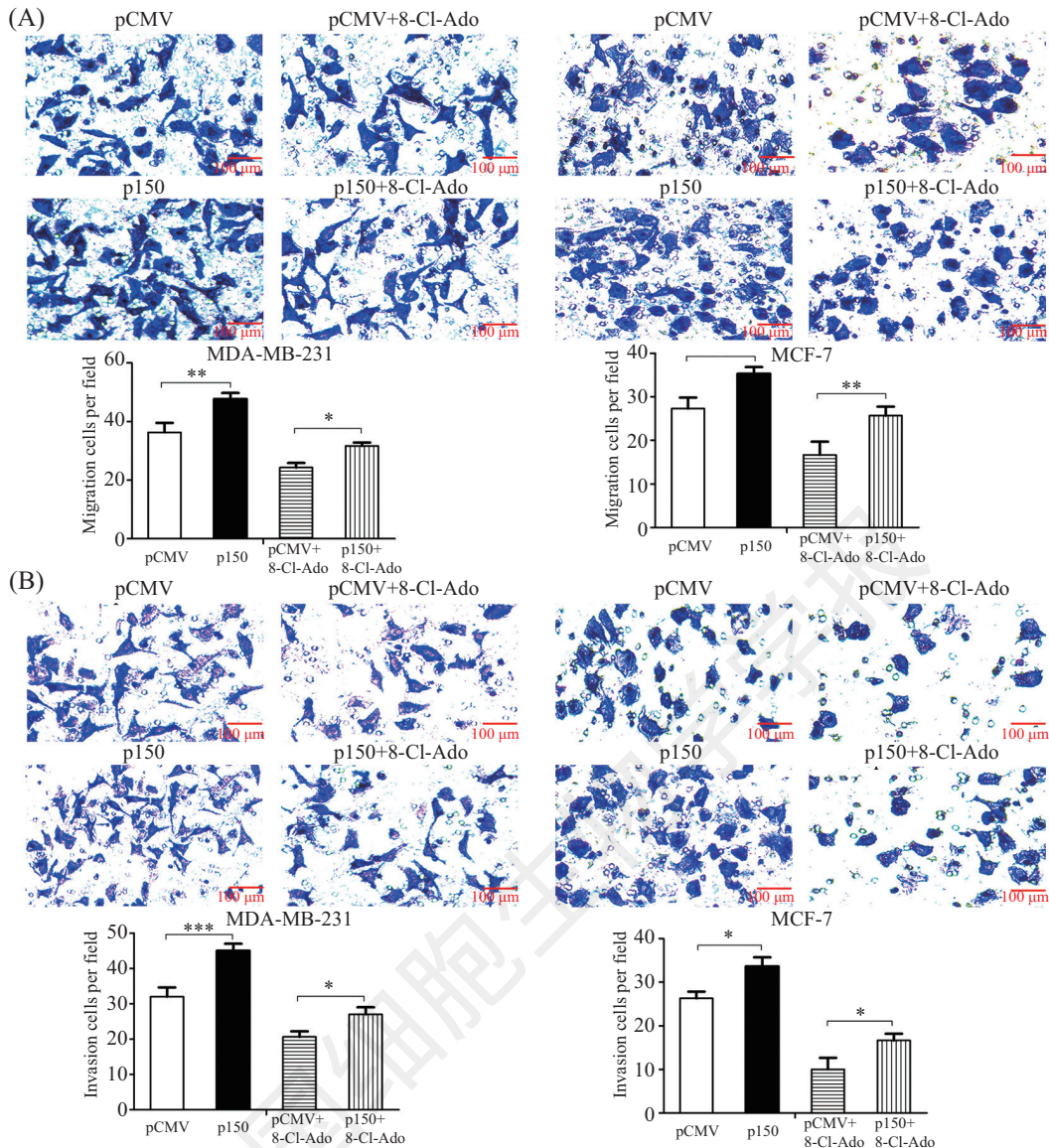

A: ADAR1-p150质粒过表达情况; B: ADAR1蛋白定量分析, *$P<0.05$, ***$P<0.001$, #$P<0.05$, ###$P<0.001$, 与相应的对照组比较; C: CCK-8检测ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞增殖的影响, *** $P<0.001$。

A: over-expression of ADAR1-p150 plasmid; B: quantitative analysis of ADAR1 protein, *$P<0.05$, ***$P<0.001$, #$P<0.05$, ###$P<0.001$, compared with the control group; C: the effect of ADAR1 overexpression on the proliferation of breast cancer cells inhibited by 8-Cl-Ado were examined by CCK-8, ***$P<0.001$.

图3 ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of ADAR1 overexpression on inhibition of proliferation of breast cancer cells by 8-Cl-Ado

A: Transswell检测ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞迁移的影响; B: Transwell检测ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞侵袭的影响。*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$。

A: the effect of ADAR1 overexpression on the migration of breast cancer cells inhibited by 8-Cl-Ado were examined by Transwell; B: the effect of ADAR1 overexpression on the invasion of breast cancer cells inhibited by 8-Cl-Ado were evaluated by Transwell. *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$.

图4 ADAR1过表达对8-Cl-Ado抑制乳腺癌细胞迁移、侵袭的影响

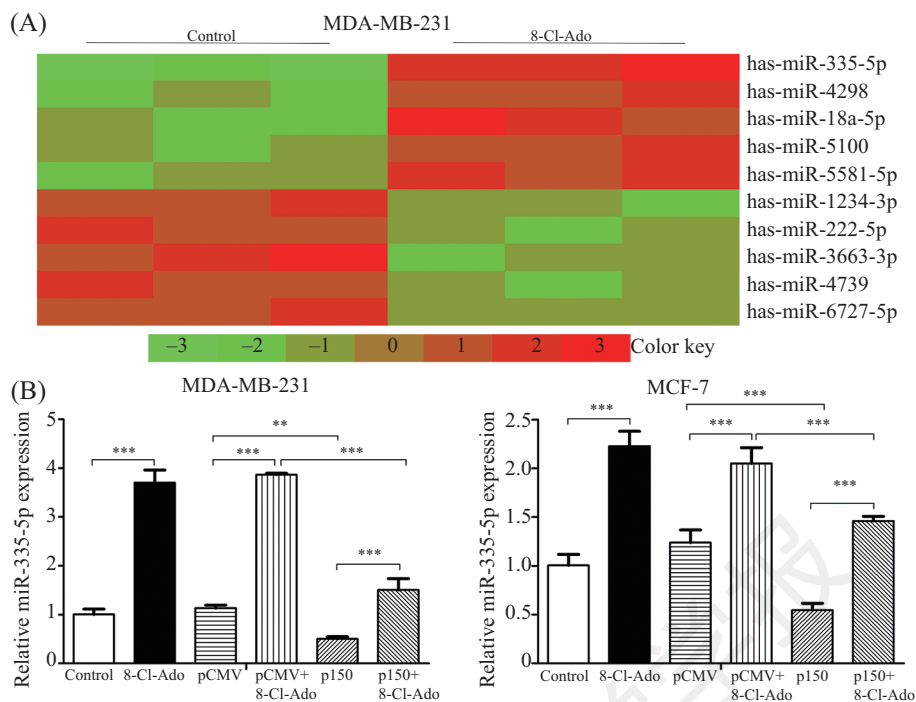**Fig.4 Effects of ADAR1 overexpression on inhibition of migration, invasion of breast cancer cells by 8-Cl-Ado**

335-5p的表达水平。

3 讨论

8-Cl-Ado是一种极具临床应用前景的抗肿瘤药, 它通过腺苷激酶在细胞内磷酸化, 形成单磷酸, 然后将其转为二磷酸和三磷酸。体内药代动力学研究表明, 8-Cl-Ado的血浆半衰期低于10 min[16-17], 它受腺苷脱氨酶作用, 在大鼠体内会迅速代谢并生成主要代谢产物8-氯腺嘌呤(8-chloro-adenine, 8-Cl-Ade)和8-氯肌苷(8-chloro-inosine, 8-Cl-Ino)[18]。而在乳腺癌细胞中, 8-Cl-Ado转化为具有细胞毒性的代谢物8-Cl-ATP, 消耗大量的内源性ATP, 在MCF-7细胞中, 8-Cl-ATP/ATP比值在12 h达到最高峰, 在BT-474细胞中, 8-Cl-ATP/ATP比值在24 h内达到高峰, 然后逐渐升高直至72 h, 最终抑制肿瘤细胞的存活, 其过程呈剂量依赖性和时间依赖性[15]。本课题组前期研究发现, 8-Cl-Ado通过下调ADAR1进而抑制HER-2阳性乳腺癌细胞SK-BR-3的增殖和迁移[7], 初步表明, 8-Cl-Ado在抗乳腺癌中的重要性, 但其具体的作用机制仍需进一步探讨。

A: miRNA芯片筛选8-Cl-Ado处理乳腺癌细胞后上调的miRNA; B: qRT-PCR检测乳腺癌细胞中miR-335-5p表达水平, **P<0.01, ***P<0.001。

A: Up-regulated miRNAs in breast cancer cells treated with 8-Cl-Ado were screened by miRNA microarray; B: miR-335-5p levels of breast cancer cells were determined by qRT-PCR, **P<0.01, ***P<0.001.

图5　miRNA芯片筛选并验证与8-Cl-Ado下调ADAR1相关的miRNA

Fig.5　Screen and verify miRNAs regulated by ADAR1 in breast cancer cells exposed to 8-Cl-Ado

　　本实验以恶性程度高, 且易复发、转移的三阴乳腺癌细胞MDA-MB-231和ER、PR阳性乳腺癌细胞MCF-7为研究对象, 进一步探究和验证8-Cl-Ado调控ADAR1抑制乳腺癌发生、发展的作用机制。研究表明, 在乳腺癌细胞中, ADAR1两种亚型的调控作用并无差异[7]。ADAR1-p150是干扰素诱导表达型的, 存在于细胞浆和细胞核中, 它的羧基端具有RNA编辑酶催化结构域(deaminase motif, DM), 中间部分有三个双链RNA结合结构域(dsRNA-binding domain, dsRBD), 氨基端有两个Z-DNA结合域(Zα和Zβ)和核信号区(nuclear export signal, NES)[12], Zα和Zβ的功能尚不清楚。而ADAR1-p110为组成表达型, 主要存在于细胞核中, 具有和ADAR1-p150相同的DM、dsRBD和Zβ结构域, 但缺少NES与Zα结构域[12]。本实验选择结构更为完整的ADAR1-p150质粒进行后续研究。实验结果表明, 8-Cl-Ado通过下调ADAR1进而抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7的增殖、迁移和侵袭, 效果十分明显。而ADAR1过表达能明显减弱8-Cl-Ado对乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用。在前期研究结果的基础上, 我们用不同类型乳腺癌细胞系和不

同实验方法, 更加全面、多方位地证实ADAR1是8-Cl-Ado抗乳腺癌的作用靶点, 8-Cl-Ado通过下调ADAR1进而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

　　据报道, ADAR1通常通过编辑细胞中的mRNA和miRNA来支持癌症细胞的生长和存活。例如, ADAR1的编辑活性抑制慢性粒细胞白血病中的miRNA水平(let-7家族), 增强白血病干细胞的自我更新能力[19]。ADAR1介导编辑miR-200b, 使其高表达, 从而促进肿瘤的迁移和侵袭[20]。因此, 我们推测, ADAR1表达下调抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用机制可能与miRNA有关。而本研究中miRNA芯片的结果表明, 8-Cl-Ado作用于乳腺癌细胞后, miR-335-5p的表达水平显著上升, 与其他miRNA相比, 差异变化最为明显。过表达ADAR1后, miR-335-5p的表达水平降低, 由此推测, ADAR1与miR-335-5p呈负向调控关系。miR-335-5p属于miR-335家族, 位于染色体7q32.2, 与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭转移及化疗耐药等有关。研究发现, miR-335-5p在骨肉瘤、肝癌、甲状腺癌及胃癌等恶性肿瘤中的表达水平较低, 它能抑制肿瘤细胞持续的生长和转移[21-24]。miR-335-5p在乳腺癌中是抑癌基因,

呈低表达状态, 而qRT-PCR检测发现, ADAR1能下调miR-335-5p的表达量。综上所述, 8-Cl-Ado通过下调ADAR1, 而ADAR1又负向调控miR-335-5p, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移。

前期研究结果表明, ADAR1的表达与乳腺癌密切相关, 而8-Cl-Ado通过下调ADAR1抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与ADAR1下调miR-335-5p有关。但是8-Cl-Ado是通过何种途径作用于ADAR1使其表达下调, 而ADAR1又是如何调控miRNA-335-5p的靶向信号通路, 最终抑制乳腺癌的生长和转移, 亟待进一步的探索和研究。因此研究8-Cl-Ado与ADAR1蛋白表达之间的相关性及ADAR1调控的miRNA, 可能为进一步在ADAR1调控miRNA的靶向信号通路这一层面上研究8-Cl-Ado的抗肿瘤作用奠定基础。

参考文献 (References)

1　Dennison JB, Ayres ML, Kaluarachchi K, Plunkett W, Gandhi V. Intracellular succinylation of 8-chloroadenosine and its effect on fumarate levels. J Biol Chem 2010; 285(11): 8022-30.

2　Stellrecht CM, Chen LS, Ayres ML, Dennison JB, Shentu S, Chen Y, *et al*. Chlorinated adenosine analogue induces AMPK and autophagy in chronic lymphocytic leukaemia cells during therapy. Br J Haematol 2017; 179(2): 266-71.

3　Stellrecht CM, Vangapandu HV, Le XF, Mao W, Shentu S. ATP directed agent, 8-chloro-adenosine, induces AMP activated protein kinase activity, leading to autophagic cell death in breast cancer cells. J Hematol Oncol 2014; 7(1): 23.

4　Han YY, Zhou Z, Cao JX, , Jin YQ, Li SY, Ni JH, *et al*. E2F1-mediated DNA damage is implicated in 8-Cl-adenosine-induced chromosome missegregation and apoptosis in human lung cancer H1299 cells. Mol Cell Biochem 2013; 384(1/2): 187-96.

5　Jiao YY, Wang XQ, Lu WL, Yang ZJ, Zhang Q. A novel approach to improve the pharmacokinetic properties of 8-chloro-adenosine by the dual combination of lipophilic derivatisation and liposome formulation. Eur J Pharm Sci 2013; 48(1/2): 249-58.

6　Duan HY, Cao JX, Qi JJ, Wu GS, Li SY, An GS, *et al*. E2F1 enhances 8-chloro-adenosine-induced G2/M arrest and apoptosis in A549 and H1299 lung cancer cells. Biochemistry (Mosc) 2012; 77(3): 261-9.

7　谢凤, 莫小梅, 杨生永, 李梨. 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. 重庆医科大学学报(Xie Feng, Mo Xiaomei, Yang Shengyong, Li Li. Effects of 8-chloro-adenosine regulating RNA editing deaminase ADAR1 on proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells. Journal of Chongqing Medical University) 2017; 42(11): 1411-6.

8　Dong XQ, Chen G, Cai ZX, Li ZL, Qiu LM, Xu HP, *et al*. CDK13 RNA over-editing mediated by ADAR1 associates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma patients. Cell Physiol Biochem 2018;

47(6): 2602-12.

9　Avesson L, Barry G. The emerging role of RNA and DNA editing in cancer. Biochim Biophys Acta 2014; 1845(2): 308-16.

10　Qi LH, Chan THM, Tenen DG, Chen LL. RNA editome imbalance in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2014; 74(5): 1301-6.

11　Steinman RA, Yang Q, Gasparetto M, Robinson LJ, Liu XP, Lenzner DE, *et al*. Deletion of the RNA-editing enzyme ADAR1 causes regression of established chronic myelogenous leukemia in mice. Int J Cancer 2013; 132(8): 1741-50.

12　Nishikura K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. Nat Rev Mol Cell Biol 2016; 17(2): 83-96.

13　Tsai HP, Huang SF, Li CF, Chien HT, Chen SC. Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. PLoS One 2018; 13(1): e0191195.

14　Yang SY, Deng P, Zhu ZW, Zhu JZ, Wang GL, Zhang LY, *et al*. Adenosine deaminase acting on RNA 1 limits RIG-I RNA detection and suppresses IFN production responding to viral and endogenous RNAs. J Immunol 2014; 193(7): 3436-45.

15　Stellrecht CM, Ayres M, Arya R, Gandhi V. A unique RNA-directed nucleoside analog is cytotoxic to breast cancer cells and depletes cyclin E levels. Breast Cancer Res Treat 2010; 121(2): 355-64.

16　Gandhi V, Chen W, Ayres M, Rhie JK, Madden TL, Newman RA. Plasma and cellular pharmacology of 8-chloro-adenosine in mice and rats. Cancer Chemother Pharmacol 2002; 50(2): 85-94.

17　窦桂芳, 楼雅卿, 邹安庆. 新抗肿瘤化合物8-氯腺苷代谢物在大鼠体内的药代动力学研究. 中国新药杂志(Dou Guifang, Lou Yaqing, Zhou Anqing. Pharmacokinetics of 8-chloro-adenosine, a new anticancer compound in rats. Chinese Journal of New Drugs) 1999; 8(11): 738-740.

18　杨莉, 齐宪荣, 石靖, 陈文倩, 张强. 8-氯腺苷长循环脂质体的制备及其在大鼠体内的药代动力学. 药学学报(Yang Li, Qi Xianrong, Shi Jing, Chen Wenqian, Zhang Qiang. Preparation of 8-chloro-adenosine long circulation liposomes and its pharmacokinetics in rats. Acta Pharmaceutica Sinica) 2005; 40(4): 382-4.

19　Zipeto MA, Court AC, Sadarangani A, Delos Santos NP, Balaian L, Chun HJ, *et al*. ADAR1 activation drives leukemia stem cell self-renewal by impairing Let-7 biogenesis. Cell Stem Cell 2016; 19(2): 177-91.

20　Wang YM, Xu XY, Yu SX, Jeong KJ, Zhou ZC, Han L, *et al*. Systematic characterization of A-to-I RNA editing hotspots in microRNAs across human cancers. Genome Res 2017; 27(7): 1112-25.

21　Wang Y, Yang T, Zhang Z, Lu M, Zhao W, Zeng XD, *et al*. Long non-coding RNA TUG1 promotes migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-335-5p in osteosarcoma cells. Cancer Sci 2017; 108(5): 859-67.

22　Wang F, Li L, Piontek K, Sakaguchi M, Selaru FM. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2018; 67(3): 940-54.

23　Luo L, Xia L, Zha BS, Zuo CL, Deng DT, Chen MW, *et al*. miR-335-5p targeting ICAM-1 inhibits invasion and metastasis of thyroid cancer cells. Biomed Pharmacother 2018; 106: 983-90.

24　Wang H, Zhang MX, Sun GP. Long non-coding RNA NEAT1 regulates the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting miR-335-5p/ROCK1 axis. Pharmazie 2018; 73(3): 150-5.