

【基础研究】

作者简介:刘冲(1987-),男,陕西西安人,学士,助理实验师,研究方向:肿瘤发生、发展及其机制。

lower than that in the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the proportion of A549 cells in G_0/G_1 phase decreased and in $S, G_2/M$ phase increased in the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P < 0.05$); the proportion of A549 cells in G_0/G_1 phase decreased in G_2/M phase increased in the $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the proportion of A549 cells in S phase between the blank control group and the $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P > 0.05$). Compared with the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group, the proportion of A549 cells in S phase decreased, while that in G_2/M phase increased in the $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the proportion of A549 cells in G_0/G_1 phase between the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group and $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P > 0.05$). The apoptosis rates of A549 cells in the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group were significantly higher than those in the blank control group ($P < 0.05$); the apoptosis rate of A549 cells in the $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group was significantly higher than that in the $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group ($P < 0.05$). The relative expression of Bak, Caspase-3 mRNA in A549 cells in the $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenosine treatment group was significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the relative expression of Bcl-2 and Mcl-2 mRNA in A549 cells between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Adenosine can inhibit the proliferation of A549 cells by inducing cell apoptosis and cell cycles arrest. Adenosine induce the apoptosis of A549 cells was associated with the up-regulation of Bak gene expression. Adenosine also can inhibit the migration of A549 cells.

Key words: adenosine; proliferation; cycle; migration; apoptosis

肺癌是目前临床上最常见的实体恶性肿瘤, 发病率及病死率多年高居恶性肿瘤首位。流行病学研究显示, 2019 年北美肺癌发病人数约 22.8 万, 死亡人数约 13.5 万^[1-2]。我国每年肺癌死亡人数高达数 10 万人, 肺癌是发病率和病死率增长最快, 对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。肺癌治疗药物的开发一直是临床研究的热点。

腺苷是一种内源性嘌呤核苷, 由 1 个腺嘌呤连接到 1 个核糖分子组成。腺苷通过与 4 种 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 结合, 在炎症、缺氧、缺血损伤、免疫疾病、肿瘤微环境、肺动脉高压等病理生理过程中发挥调节作用^[3-6]。近年来研究发现, 腺苷可以作为信号分子, 通过不同的信号通路影响肿瘤细胞的生物学行为^[7], 如引发细胞周期阻滞, 诱导肿瘤细胞凋亡, 影响细胞增殖, 但其对不同肿瘤细胞的作用并不一致。MUJOMDAR 等^[8]研究发现, 腺苷对人结肠癌细胞增殖具有促进作用; 高文强等^[9]和 SAITO 等^[10]研究发现, 腺苷对胃癌细胞和结肠癌细胞增殖具有抑制作用。以上研究结果表明, 腺苷对肿瘤细胞生物学行为的影响存在肿瘤特异性。目前关于腺苷对人肺癌细胞系 A549 凋亡的影响尚未见报道, 基于此, 本研究观察了腺苷在体外对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移、细胞周期和凋亡的影响, 以期对腺苷类药物治疗肺癌提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 人肺癌细胞系 A549 为本实验室保存细胞株; 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dul-

becco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自美国 Invitrogen 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 腺苷购自美国 Life Technologies 公司, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、细胞周期、凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物有限公司, TRIzol 及反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂购自瑞士 Roche 公司; Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司, Epoch 超微量分光光度计购自美国 BIO-TEK 公司, IX71 倒置显微镜购自日本奥林巴斯株式会社, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 A549 细胞接种于含体积分数 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 置于 37°C 含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖能力 取对数生长期 A549 细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化收集细胞, 将细胞接种于 2 个 96 孔板, 每孔接种 3 000 个细胞, 培养过夜, 待细胞贴壁后, 吸弃培养液, 将细胞分为空白对照组和 $0.5, 1.0, 2.5, 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺苷处理组, 每组设 8 个复孔, 各组细胞分别加入含 $0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺苷的培养液。上述 2 个 96 孔板分别于培养 24、48 h 后, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8, 置于 37°C CO_2 培养箱中孵育 3 h, 检测各孔在 450 nm 处的吸光度值。细胞抑制率 = $[(\text{空白对照组吸光度值} - \text{处理组吸光度值}) / \text{空白对照组吸光度值}] \times 100\%$ 。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期 A549 细胞接种于 6 孔板,将细胞分为空白对照组、2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组和 5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组,每组设 3 个复孔。培养至细胞密度达 80% 时,用无菌枪头制备划痕,然后用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 遍。空白对照组细胞加入 2 mL 无血清培养液,腺苷处理组分别加入含 2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷无血清培养液 2 mL,分别于 0、12、24 h 采用倒置显微镜成像系统进行观察并拍照。细胞相对迁移率 = [(初始划痕宽度 - 培养后划痕宽度)/初始划痕宽度] × 100%。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期分布情况 取对数生长期 A549 细胞接种于 6 孔板,每孔 5 × 10⁵ 个细胞。将细胞分为空白对照组、2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组和 5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组,分别加入含 0.0、2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷的培养液,培养 24 h 后胰蛋白酶消化收集细胞,100 μL PBS 重悬细胞,加入 1 mL 体积分数 75% 预冷无水乙醇固定 2 h,1 000 r · min⁻¹离心 5 min 收集细胞,PBS 洗涤,加入 450 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)及 50 μL 核糖核酸酶 A(ribonuclease A, RNaseA),室温避光反应 30 ~ 60 min,流式细胞术检测细胞周期分布。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 A549 细胞接种于 6 孔板中,每孔 5 × 10⁵ 个细胞,将细胞分为空白对照组、2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组和 5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组。分别加入含 0.0、2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷的培养液,培养 24 h,用含体积分数 0.25% 无乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化收集各组细胞, PBS 洗涤细胞 2 次,加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,分别加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 与 5 μL 的 PI,混匀,室温避光反应 10 min,流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.2.6 qRT-PCR 检测细胞凋亡相关基因表达 收集空白对照组和 5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组细胞,提取 mRNA,采用 TaKaRa 反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR,每组设 3 个复孔,检测细胞中 Bcl-2、Bak、Mcl-1、Caspase-3 mRNA 相对表达量。Bcl-2 上游引物序列为 5'-GAACTGGGGGAGGATTGTGG-3',下游引物序列为 5'-CCGGTTCAGTACTCAGTCA-3'; Bak 上游引物序列为 5'-ATGGCTTGGGGGCAAGGC-3',下游引物序列为 5'-TCATGATTTGAATCTTCGTACC-3'; Mcl-1 上游引物序列为 5'-TGCCGCTGCTGGAGTTG-GTTT-3',下游引物序列为 5'-ACAGTAAGGCTATCT-

TATTAGAT-3';Caspase-3 上游引物序列为 5'-ATG-GAAGCGAATCAATGGACTC-3',下游引物序列为 5'-CTGTACCAGACCGAGATGTCA-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物序列为 5'-GGTGGTCTCTCTGACTTCAA-CAG-3',下游引物序列为 5'-GTTGCTGTAGCCAAAT-TCGTTGT-3'。以 GAPDH 为内参,利用 2^{-ΔΔCt}法计算 Bcl-2、Bak、Mcl-1、Caspase-3 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组 A549 细胞抑制率比较 结果见表 1。0.5、1.0、2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组 A549 细胞培养 24、48 h 的生长抑制率均高于空白对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);各浓度腺苷处理组 A549 细胞培养 24、48 h 的生长抑制率随浓度的升高逐渐增加,两两比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 5 组 A549 细胞抑制率的比较
Tab.1 Comparison of the inhibition rate of A549 cells among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞抑制率/%	
		24 h	48 h
空白对照组	8	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	8	4.17 ± 0.71 ^a	2.07 ± 0.45 ^a
1.0 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	8	8.87 ± 1.14 ^{ab}	13.49 ± 1.25 ^{ab}
2.5 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	8	20.87 ± 3.07 ^{abc}	47.15 ± 3.24 ^{abc}
5.0 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	8	26.40 ± 3.35 ^{abcd}	52.40 ± 4.35 ^{abcd}

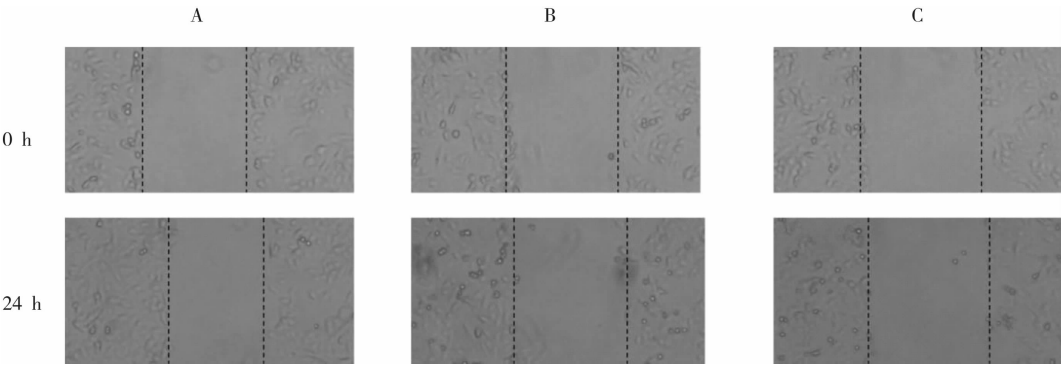
注:与空白对照组比较^a*P* < 0.05;与 0.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较^b*P* < 0.05;与 1.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较^c*P* < 0.01;与 2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较^d*P* < 0.05。

2.2 3 组 A549 细胞相对迁移率比较 结果见表 2 和图 1。2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组 A549 细胞相对迁移率均显著低于空白对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组 A549 细胞相对迁移率显著低于 2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 2 3 组 A549 细胞相对迁移率比较
Tab.2 Comparison of cell relative migration rate of A549 cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞相对迁移率/%
空白对照组	3	7.50 ± 0.52
2.5 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	3	2.37 ± 0.35 ^a
5.0 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	3	0.68 ± 0.14 ^{ab}

注:与空白对照组比较^a*P* < 0.05;与 2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较^b*P* < 0.05。



A:空白对照组;B:2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组;C:5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组。

图1 3组细胞迁移能力(×40)

Fig.1 Cell migration ability of the three groups(×40)

2.3 3组A549细胞细胞周期比较 结果见表3和图2。与空白对照组比较,2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞处于G₀/G₁期比例显著降低,S期比例升高,G₂/M期比例升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞处于G₀/G₁期比例显著降低,G₂/M期比例显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组和5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞处于S期比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较,5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞处于S期比例降低,G₂/M期比例

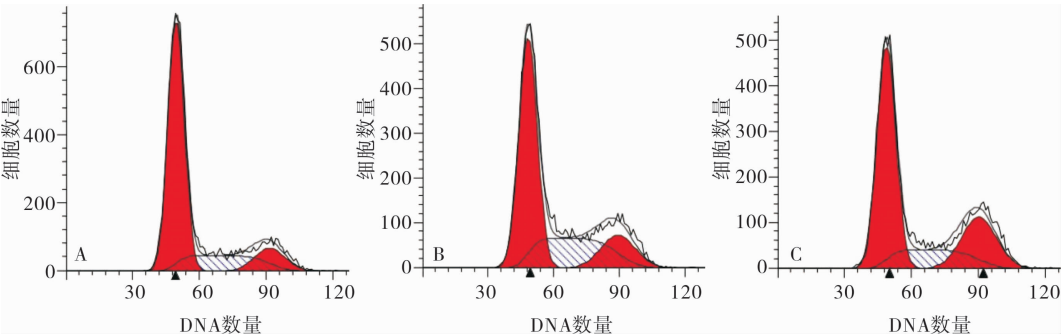
升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组和5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组细胞处于G₀/G₁期比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 3组A549细胞周期比较

Tab.3 Comparison of cell cycle of A549 cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期		
		G ₀ /G ₁ /%	S/%	G ₂ /M/%
空白对照组	3	67.73 ± 1.32	19.52 ± 1.67	11.70 ± 2.32
2.5 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	3	56.50 ± 1.54 ^a	27.60 ± 2.32 ^a	14.60 ± 1.79 ^a
5.0 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	3	56.87 ± 2.14 ^a	18.70 ± 1.85 ^b	23.41 ± 2.32 ^{ab}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组比较^b $P < 0.05$ 。



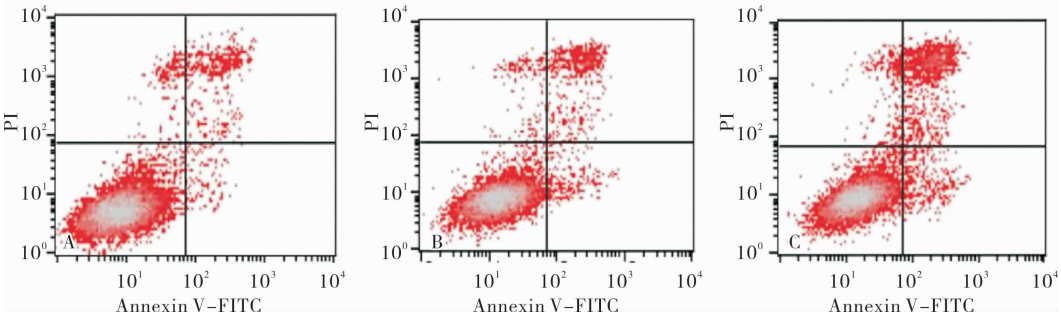
A:空白对照组;B:2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组;C:5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组。

图2 3组细胞周期分布

Fig.2 Cell cycle distribution of the three groups

2.4 3组A549细胞凋亡率比较 结果见图3。空白对照组及2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞凋亡率分别为(5.27 ± 1.13)%、(9.12 ± 2.38)%、(17.27 ± 2.54)%、2.5、5.0 mmol · L⁻¹腺

苷处理组A549细胞凋亡率显著高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组A549细胞凋亡率显著高于2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:空白对照组;B:2.5 mmol · L⁻¹腺苷处理组;C:5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组。

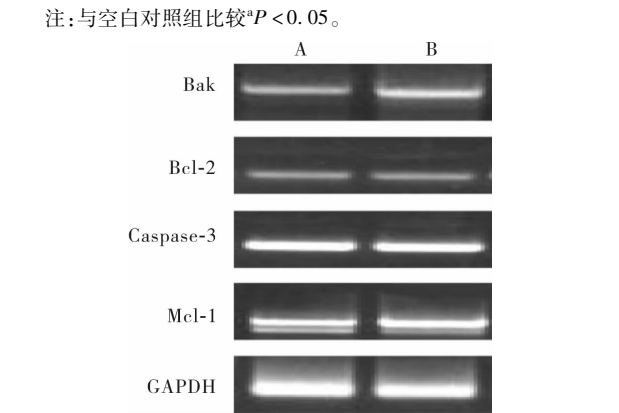
图3 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.3 Cell apoptosis detected by flow cytometry

2.5 2 组 A549 细胞中 Bcl-2、Bak、Mcl-1、Caspase-3 mRNA 相对表达量比较 结果见表 4 和图 4。5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组细胞中 Bak、Caspase-3 mRNA相对表达量显著高于空白对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);2 组细胞中 Bcl-2、Mcl-1 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 2 组 A549 细胞中 Bcl-2、Bak、Mcl-1、Caspase-3 mRNA 相对表达量比较

Tab. 4 Comparison of the relative expression of Bcl-2, Bak, Mcl-1, Caspase-3 mRNA in A549 cells between the two groups					
(x̄ ± s)					
组别	n	Bcl-2 mRNA	Bak mRNA	Mcl-1 mRNA	Caspase-3 mRNA
空白对照组	3	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.35
0.5 mmol · L ⁻¹ 腺苷处理组	3	1.30 ± 0.24	4.82 ± 0.44 ^a	1.20 ± 0.18	2.12 ± 0.52 ^a



A:空白对照组;B:5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组。
图 4 空白对照组和 5.0 mmol · L⁻¹腺苷处理组 A549 细胞中凋亡相关分子表达水平

Fig. 4 Expression of apoptosis related molecular in A549 cells in the blank control group and 5.0 mmol · L⁻¹ adenosine treatment group

3 讨论

作为发病率最高、临床最为常见的肿瘤,肺癌的病死率居恶性肿瘤首位,在患者病情发展过程中,癌症转移是导致其预后不良的主要因素之一。放射治疗、化学治疗是癌症转移后主要的治疗手段,但长期应用会使肺癌细胞产生耐受,导致 5 a 生存率低^[11]。因此,寻找新的可以抑制肿瘤生长的药物是目前肺癌治疗的迫切需要。腺苷是最丰富的细胞内代谢物之一,也是重要的自分泌/旁分泌信使^[12-13]。有研究报道,腺苷可以影响细胞周期的进展,如 SHIRALI 等^[14]和 JAFARI 等^[15]分别在卵巢癌细胞 OVCAR-3 和乳腺癌干细胞中发现,腺苷可以通过 Cdk4/cyclind1 途径诱导细胞 G₀/G₁ 期阻滞。而王会平等^[16]研究发现,腺苷可以显著抑制细胞增殖,并引起 MCF-7 细胞 G₂/M 期阻滞。

腺苷可以通过诱导细胞凋亡来抑制肿瘤细胞的生长,但其诱导细胞凋亡的机制不尽相同。MA 等^[17]在肝癌细胞中发现,腺苷可通过增加细胞活性氧的产生激活 Caspase-8 和 Caspase-9,诱导凋亡调节因子 Bak 的积累,导致线粒体膜功能障碍,从而触发细胞凋亡。TSUCHIYA 等^[18]在胃癌中发现,腺苷可通过腺苷激酶转化为单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate,AMP),AMP 激活腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase,AMPK)。AMPK 是导致 gtp-3-tkb 胃癌细胞 Caspase 非依赖性凋亡的因子。YU 等^[19]研究发现,腺苷可增加肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor,TNFR1) 和受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (receptor interacting serine/threonine kinase 1,RIPK1) 的表达以及 p38 的磷酸化,TNFR1 或 RIPK1 的下调会抑制 p38 的激活,阻断聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶的分裂,诱导结肠癌细胞发生凋亡。

本实验以肺癌细胞 A549 为研究模型,研究了腺苷对 A549 细胞的增殖、迁移、细胞周期和凋亡的影响。结果发现,腺苷可以抑制 A549 细胞的增殖,并且呈时间和剂量依赖性。进一步分析显示,腺苷处理可导致细胞周期 G₂/M 期阻滞和细胞凋亡,且凋亡率呈剂量依赖性;提示腺苷对 A549 细胞增殖的抑制作用是通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡实现的。为进一步研究腺苷诱导 A549 细胞凋亡的机制,本研究检测了凋亡通路中相关分子的表达水平,结果发现,促凋亡因子 Bak 和 Caspase-3 表达量显著升高,而凋亡抑制因子 Bcl-2 和 Mcl-1 无明显变化。有研究报道,Bak 的寡聚体可插入线粒体膜增加线粒体的通透性,从而形成细胞色素 C 和更大分子的通道^[20]。此外,定位于线粒体上的转录因子 p53 能与 Bak 相互作用,使它们处于凋亡的构象并引起多聚化^[21-22],从而导致线粒体通透性改变。细胞色素 C 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。释放到细胞质的细胞色素 C 在脱氧腺苷三磷酸存在的条件下能与凋亡酶相关因子-1 (apoptotic protease activating factor-1,Apaf-1) 结合,并促使 Caspase-9 与其结合形成凋亡小体,Caspase-9 被激活,从而激活其他的 Caspase,如 Caspase-3 等。Caspase-3 是线粒体凋亡通路中重要环节,Caspase-3 的激活被认为是细胞发生不可逆凋亡的标志^[23-24]。本研究还检测了腺苷对 A549 细胞迁移的影响,结果显示,腺苷可显著抑制 A549 细胞的迁移能力,且该抑制作用呈剂量依赖性,GAO 等^[25]研究发现,腺苷处理后宫颈癌细胞中上皮标志物 E-cadherin 显著升高,而 N-cadherin、

纤连蛋白等间质标志物降低,表明腺苷可通过抑制上皮细胞向间质转化来抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。而腺苷对肺癌细胞 A549 迁移的抑制作用是否也是通过抑制上皮间充质转化来实现的尚需进一步研究。

综上所述,腺苷可以通过细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡来抑制肺癌细胞 A549 的增殖,腺苷诱导细胞发生凋亡的机制可能是通过诱导促凋亡因子 Bak 的积累,导致线粒体膜通透性改变,细胞色素 C 释放到细胞质,激活 Caspase 家族而导致的。本研究为体外细胞实验,腺苷对肺癌的杀伤作用还需进一步进行动物模型研究。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1):7-30.

[3] ANTONIOLI L, FORNAI M, BLANDIZZI C, et al. Adenosine signaling and the immune system: when a lot could be too much [J]. *Immunol Lett*, 2019, 205(1):9-15.

[4] BESSA-GONCALVES M, BRAGANCA B, MARTINS-DIAS E, et al. Is the adenosine A2B 'biased' receptor a valuable target for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(6):1285-1292.

[5] CHEN M, WEI L, LAW C T, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6):2254-2270.

[6] MORANDI F, HORENSTEIN A L, RIZZO R, et al. The role of extracellular adenosine generation in the development of autoimmune diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018:7019398.

[7] YANG D, YAGUCHI T, YAMAMOTO H, et al. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(10):1665-1675.

[8] MUJUMDAR M, HOSKIN D, BLAY J. Adenosine stimulation of the proliferation of colorectal carcinoma cell lines. Roles of cell density and adenosine metabolism [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(9):1737-1747.

[9] 高文强, 刘坤, 周艳, 等. 腺苷对人胃癌 MGC-803 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(13):44-47, 55.

[10] SAITO M, YAGUCHI T, YASUDA Y, et al. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A (1) adenosine receptors [J]. *Cancer Lett*, 2010, 290(2):211-215.

[11] SRDIC D, PLESTINA S, SVERKO-PETERNAC A, et al. Cancer cachexia, sarcopenia and biochemical markers in patients with advanced non-small cell lung cancer-chemotherapy toxicity and prognostic value. Supportive care in cancer [J]. *Support Care Cancer*, 2016, 24(11):4495-4502.

[12] CHEN J F, ELTZSCHIG H K, FREDHOLM B B. Adenosine receptors as drug targets; what are the challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(4):265-286.

[13] ELTZSCHIG H K. Extracellular adenosine signaling in molecular medicine [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(2):141-146.

[14] SHIRALI S, AGHAEI M, SHABANI M, et al. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclin D1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3 [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2):1085-1095.

[15] JAFARI S M, JOSHAGHANI H R, PANJEHPOUR M, et al. Apoptosis and cell cycle regulatory effects of adenosine by modulation of GLI-1 and ERK1/2 pathways in CD44⁺ and CD24⁺ breast cancer stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(4):e12345.

[16] 王会平, 郝赵伟, 刘冲, 等. 腺苷抑制乳腺癌细胞增殖和迁移的机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(9):1349-1352.

[17] MA Y, ZHANG J, ZHANG Q, et al. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(1):8-14.

[18] TSUCHIYA A, NISHIZAKI T. Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(39):10931-10935.

[19] YU S, HOU D, CHEN P, et al. Adenosine induces apoptosis through TNFR1/RIPK1/P38 axis in colon cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3):759-765.

[20] NUTT L K, PATAER A, PAHLER J, et al. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11):9219-9225.

[21] BAUER J H, HELFAND S L. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53 [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(5):437-440.

[22] SAMUELS-LEV Y, O'CONNOR D J, BERGAMASCHI D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53 [J]. *Mol Cell*, 2001, 8(4):781-794.

[23] 方慧华, 李洪娇, 何小蕾, 等. 小檗碱及其衍生物抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(6):429-433.

[24] 邹翔, 曲中原, 季宇彬. 胡桃醌经由活性氧介导 JNK、p38 通路诱导 SGC-7901 细胞凋亡 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(7):544-549.

[25] GAO Z W, WANG H P, DONG K, et al. Adenosine inhibits migration, invasion and induces apoptosis of human cervical cancer cells [J]. *Neoplasma*, 2016, 63(2):201-207.

(本文编辑: 孟 月)