

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.19.005

DDX1 基因下调对宫颈鳞癌 SiHa 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的影响 *

陈建欢^{1,2} 王蕾^{1,2} 马蓉¹ 陈复刚¹ 马彩玲^{1,2Δ}

(1 省部共建中亚高发成因与防治国家重点实验室 新疆医科大学第一附属医院妇科中心 新疆 乌鲁木齐 830054;

2 新疆医学动物模型研究重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:探讨下调 DEAD-box 解旋酶 1(DDX1)基因对宫颈鳞癌 SiHa 细胞增殖、凋亡、转移及侵袭能力的影响。**方法:**siRNA 转染构建 DDX1 低表达 SiHa 细胞系、和阴性对照组,用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测 DDX1 的 mRNA 和蛋白表达水平。应用 CCK8 法、流式细胞技术、Transwell 实验分别检测 DDX1 低表达对 SiHa 细胞增殖、凋亡、转移和侵袭能力的影响。**结果:**(1)mRNA 水平检测显示:下调 DDX1, Si-DDX1 组中 DDX1 表达均低于 Si-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。蛋白水平检测显示, Si-DDX1 组中 DDX1 表达低于 Si-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)下调 DDX1 后, Si-DDX1 组细胞的增殖活性较 Si-NC 组升高, Si-DDX1 组的凋亡率较 Si-NC 组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。(3)下调 DDX1 后, Si-DDX1 组细胞转移率和侵袭率均较 Si-NC 组增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**DDX1 的表达受到抑制后,宫颈鳞癌 SiHa 细胞的增殖能力增强、凋亡能力减弱,转移和侵袭能力增强。

关键词:DDX1 基因;宫颈鳞癌;增殖;凋亡;侵袭;转移

中图分类号:R-33;R737.33 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)19-3628-05

Effects of Dead-box 1 Gene Down-regulation on the Proliferation, Apoptosis, Invasion and Migration of Cervical Squamous Cell Carcinoma SiHa Cells*

CHEN Jian-huan^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, MA Rong¹, CHEN Fu-gang¹, MA Cai-ling^{1,2Δ}

(1 State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia,

Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China;

2 Xinjiang Key Laboratory of Medical Animal Model Research, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the impact of downregulating DDX1 gene on growth, apoptosis, metastasis, and invasion of SiHa cells in cervical cancer. **Methods:** A DDX1-low-expression SiHa cell line was established via siRNA transfection, alongside a negative control group. The mRNA and protein expression levels of DDX1 were assessed using RT-qPCR and Western Blot analysis, respectively. Additionally, CCK8 assay, flow cytometry analysis, and Transwell assay were conducted to evaluate the effect of decreased DDX1 expression on proliferation, apoptosis, metastasis, and invasion of SiHa cells. **Results:** (1) Analysis of mRNA levels revealed significantly lower expression of DDX1 in the Si-DDX1 group compared to the Si-NC group ($P<0.05$). Similarly, analysis at the protein level demonstrated a statistically significant decrease in DDX1 expression in the Si-DDX1 group compared to the Si-NC group ($P<0.05$). (2) Down-regulation of DDX1 resulted in increased cellular proliferation activity in the Si-DDX1 group compared to the Si-NC group ($P<0.05$), while exhibiting a lower rate of apoptosis ($P<0.05$). (3) Decreased expression of DDX1 led to higher rates of metastasis and invasion in the Si-DDX1 group compared to the Si-NC group with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusions:** Inhibition or reduction of DDX1 expression enhances cellular proliferation ability while weakening apoptotic capability; additionally promoting metastatic potential and invasive abilities within SiHa cells.

Key words: DDX1; Cervical squamous cell carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Migration; Invasion

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2024)19-3628-05

前言

宫颈癌是女性最常见的生殖器官恶性肿瘤,在无明显浸润和转移的情况下,生存率可维持在 80%-90%。而对于已发展至

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82260613);

省部共建中亚高发成因与防治国家重点实验室开放课题(SKL-HIDCA-2019-32;SKL-HIDCA-2022-2)

作者简介:陈建欢(1987-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:宫颈恶性肿瘤,E-mail: 1678989962@qq.com

Δ 通讯作者:马彩玲,女,博士,教授,主要研究方向:宫颈恶性肿瘤,E-mail: hymcl@sina.com

(收稿日期:2024-02-08 接受日期:2024-02-28)

局部晚期或呈现浸润侵袭特性的病例,五年生存率则显著下滑至 17%^[12],提示宫颈癌的浸润和侵袭对预后起决定性作用。DDX1 是一种死亡相关蛋白样结构域蛋白,属于 RNA 解旋酶家族,通过调节细胞周期、参与 RNA 代谢过程及影响免疫细胞在肿瘤微环境中的浸润,在肿瘤转移及预后中发挥重要的生物学意义^[3]。自首次在视网膜母细胞瘤中发现以来,科学家们陆续证实 DDX1 与结直肠癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌等多种癌症的发生和预后有关^[4-7]。DDX1 通过影响基因组稳定性与肿瘤细胞对化疗药物(如铂类药物)的敏感性有着直接联系,这为基于 RNA 解旋酶的肿瘤个性化精准治疗提供了新思路^[8]。作为一种泛癌基因,DDX1 是否与宫颈癌的发生和发展相关目前尚缺乏深入的基础研究。为探讨 DDX1 对宫颈癌细胞生物学功能的影响,本研究验证 DDX1 敲低前后宫颈鳞癌 SiHa 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的变化,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人子宫颈鳞癌 SiHa 细胞、培养液购于武汉普诺赛,DMEM、胎牛血清及胰蛋白酶购于美国 Gibco,CCK8 试剂盒购于美国 Med Chem Express,Lipofectamine 2000 转染试剂盒购于美国 Invitrogen,凋亡试剂盒购自上海翌圣。

1.2 细胞培养与转染

SiHa 细胞培养于 DMEM 培养基,加 10%胎牛血清和抗生素置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养,细胞生长至 50%~60%时启动转染程序。设计的引物序列信息见表 1。将 si-RNA 和 Lipofectamine 2000 转染 SiHa 细胞,提取 RNA 质检定组,收集细胞进行后续实验步骤。

1.3 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参,使用 Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 进行实时定量 PCR (RT-qPCR),2^{-ΔΔCT} 法计算 DDX1 的 mRNA 表达量。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

裂解液提取蛋白并检测浓度,10% SDS-PAGE 分离蛋白、转膜,5%脱脂牛奶封闭,加一抗 4℃冰箱孵育过夜。次日 TBST 洗膜 5 次,二抗孵育 45 分钟,显色液显色,凝胶成像系统拍摄蛋白条带。

1.5 CCK8 检测细胞增殖

siRNA 转染细胞 48 小时后,加入 10 μL CCK8 溶液,混匀后培养箱中孵育 3 小时,测定转染 0 小时、48 小时、72 小时后 450 nm 处的 A 值。

1.6 Annexin V 和 PI 检测细胞凋亡

取生长状态良好的实验用细胞,胰酶消化后重悬,离心收集各组细胞 PBS 漂洗 1 次,加结合缓冲液重悬细胞,依据试剂盒说明书,先后加入 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育对样本采用流式细胞仪检测。每个样品重复 3 次。

1.7 Transwell 检测细胞侵袭、转移

侵袭实验中,首先在预涂基质胶的小室内孵育细胞,细胞密度设定为 8×10⁵ 个/mL,上室加载细胞,下室添加 10%FBS 培养基,培养后固定、结晶紫染色,镜下计数侵袭细胞。转移实验先行 PBS 湿润小室,再调整细胞浓度至 4×10⁵ 个/mL,后续步骤同侵袭实验,完成固定、结晶紫染色后镜下计数。

1.8 统计学处理

使用 IBM SPSS Statistic 22.0 进行统计学分析,计量资料均以平均数标准差 $\bar{x} \pm s$ 记录,两独立样本采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer Sequence Information

Number	Gene name	Sense (5'-3') sequence	Antisense (5'-3') sequence
Si-NC	Si-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Si-1	DDX1-homo-1017	GCUGAACUGAAAAUUUAAACUTT	AGUUAUUUUUCAGUUCAGCTT
Si-2	DDX1-homo-1199	GGAGUUAGCUGAACAAACUTT	AGUUUGUUCAGCUAACUCCTT
Si-3	DDX1-homo-1694	GAGCCACAUUAGAACUGAUTT	AUCAGUUCUAAUGUGGCUCTT

2 结果

2.1 下调 DDX1 细胞系的构建检测

质检生长良好的序列 2 组(DDX1-homo-1199)进行后续实验操作。转染后,mRNA 水平检测显示:Si-DDX1 组中 DDX1 表达均低于 Si-NC 组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 1。蛋白水平检测显示,si-DDX1 组中 DDX1 表达低于 Si-NC 组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 2。

2.2 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡能力的影响

CCK-8 实验结果显示,转染 72 小时后,si-DDX1 组细胞的增殖活性较 Si-NC 组升高,差异有统计学意义(P<0.05),见图 3。流式细胞术检测显示,转染 48 小时后,si-DDX1 组的凋亡率较 Si-NC 组降低,差异有统计学意义(P<0.05),见图 4。

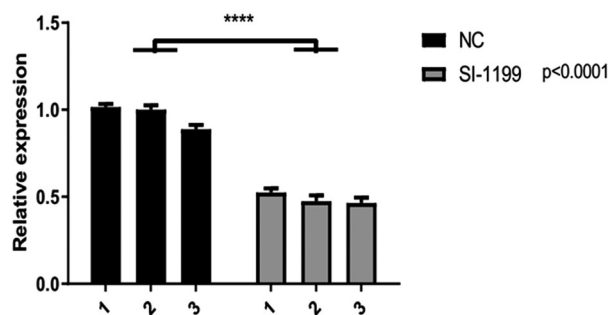


图 1 下调 SiHa 细胞中 DDX1 mRNA 表达

Fig.1 Down-regulation of DDX1 mRNA expression in SiHa cells

2.3 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验计数显示,si-DDX1 组细胞侵袭的细胞量

为 Si-NC 组的 1.22 倍, 较 Si-NC 组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.4 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞转移能力的影响

Transwell 实验计数显示, Si-DDX1 组细胞转移的细胞量为 Si-NC 组的 1.47 倍, 较 Si-NC 组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

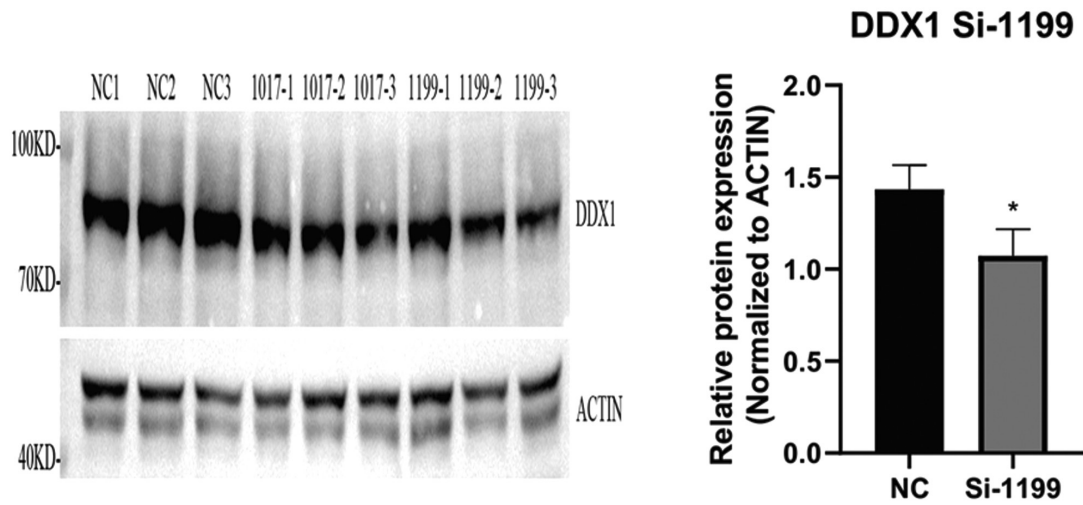


图 2 下调 SiHa 细胞中 DDX1 蛋白表达

Fig.2 Down-regulated DDX1 protein expression in SiHa cells

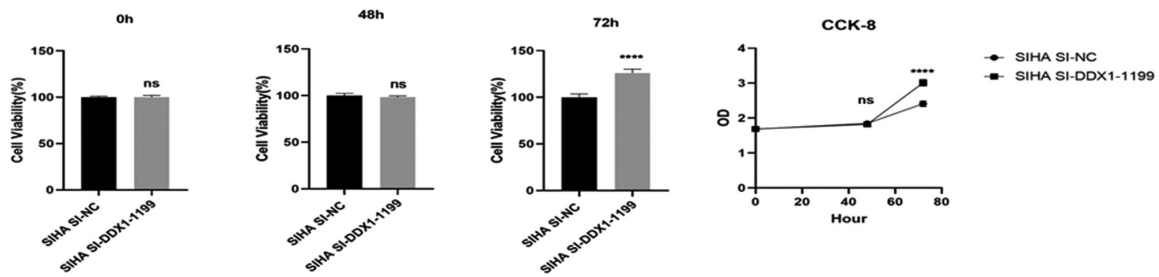


图 3 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effect of DDX1 downregulation on the proliferative capacity of SiHa cells in cervical cancer

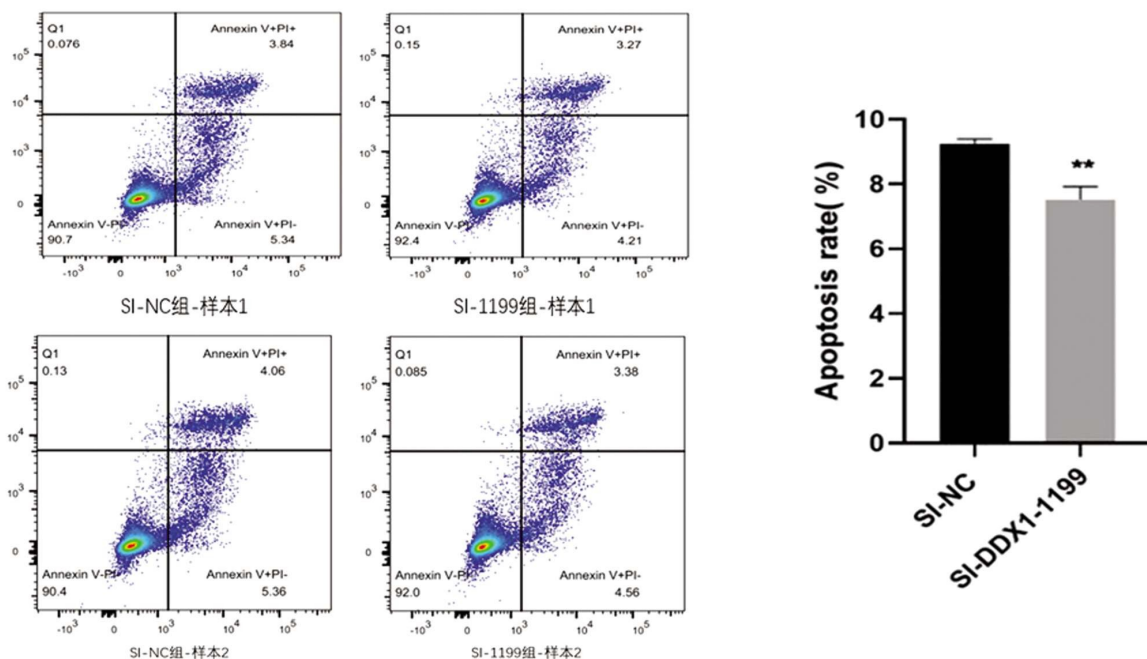


图 4 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡能力的影响

Fig.4 The effect of DDX1 downregulation on the apoptotic capacity of SiHa cells in cervical cancer

3 讨论

流行病学数据显示, 宫颈癌患者的长期生存状况与其疾病的侵袭性和转移潜能紧密相关, 特别是当疾病进展至局部晚期

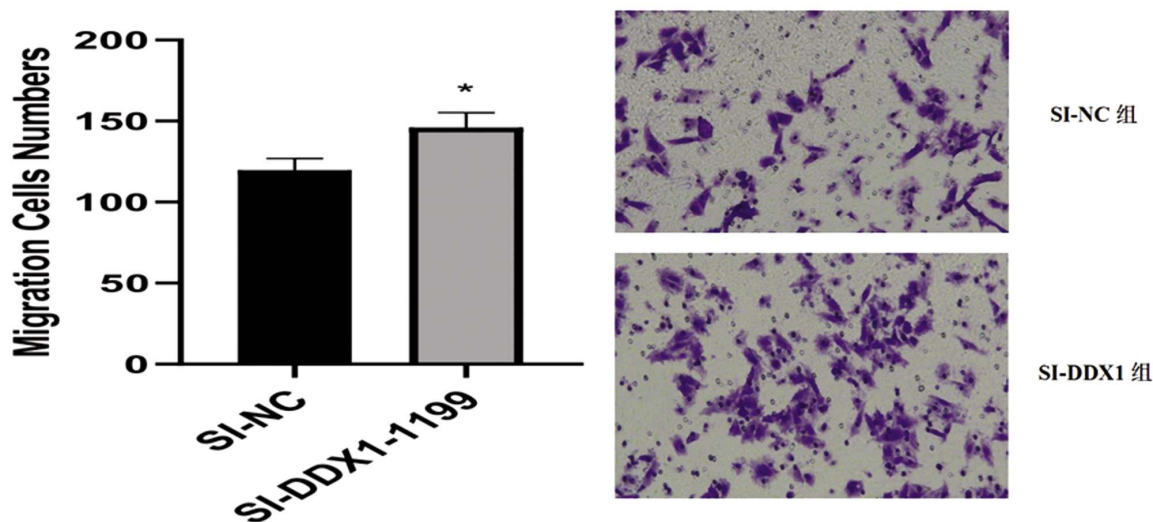


图5 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞侵袭能力的影响

Fig.5 The effect of DDX1 downregulation on the invasive capability of SiHa cells in cervical cancer

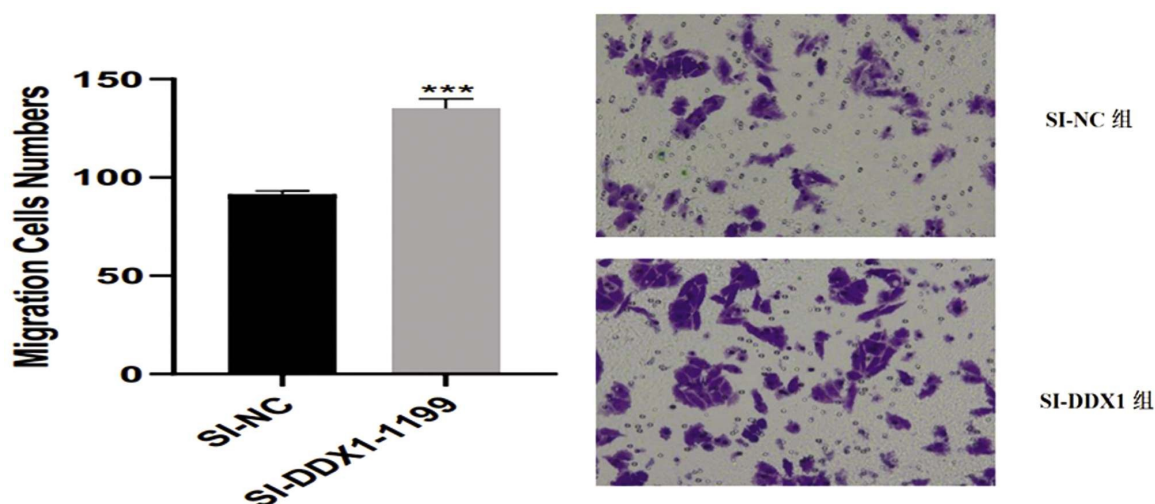


图6 下调 DDX1 对宫颈癌 SiHa 细胞转移能力的影响

Fig.6 The effect of DDX1 downregulation on the migratory capacity of SiHa cells in cervical cancer

时,患者的五年生存率显著降低。因此,了解调控肿瘤侵袭和转移的关键分子机制尤为重要。

DDX1 作为 DEAD-box RNA 解旋酶家族的一员,已在多个研究中展现其在肿瘤发展中扮演的重要角色。DDX1 在正常生理条件下普遍存在,尤其在增殖活跃的肿瘤细胞和特定来源的细胞呈差异性表达^[9]。Tanaka K 等^[10]研究指出,DDX1 通过调节 cyclin-D2、CD9 和 GDF3 等干细胞相关基因的转录活性,促进了小鼠睾丸肿瘤的发生。在结直肠癌中,DDX1 通过调节 LGR5 基因的转录活动影响结直肠癌细胞的增殖^[11]。DDX1 的高水平表达与肝癌患者的预后不良显著相关^[12],这可能与它的功能失调导致 DNA 修复、RNA 运输失常以及免疫细胞(如 CD8⁺T 细胞)浸润受到影响有关。本研究建立 DDX1 敲减的宫颈癌 SiHa 细胞系,通过 RT-qPCR 和 Western Blot 实验验证 DDX1 在 mRNA 和蛋白水平上的表达下调。体外功能实验显示,DDX1 表达降低后, SiHa 细胞的增殖活性增强,凋亡率降低。李继喜团队^[13]通过体外实验证实了 DDX1 在人源肿瘤细胞系中的功能性作用,DDX1 的敲除能够显著影响细胞活力,暗示它在 DNA 修复途径中发挥作用。以上研究结果表明,DDX1

不仅是肿瘤发展的关键调控因子,还可能通过 DNA 损伤修复机制和影响免疫反应来改变肿瘤对化疗、免疫疗法的敏感性^[14]。肿瘤细胞的强转移能力是导致肿瘤进展和死亡的主要原因^[15]。本研究发现,下调 DDX1 使 SiHa 细胞的迁移和侵袭能力显著提高,表明 DDX1 的异常表达可能是宫颈癌细胞远期转移的机制之一,靶向调控 DDX1 能抑制细胞过度增殖、阻止肿瘤转移进展^[16]。近年来有研究发现,DDX1 可能通过癌症干细胞相关信号通路、DNA 修复和细胞周期调控通路和免疫调控通路等促进肿瘤的侵袭和转移能力^[17-20]。

本课题组在前期研究发现,人源性宫颈癌组织中 DDX1 的高表达与较差的预后相关,可能发挥促癌作用。结合本次体外实验结果,DDX1 显示出一定的抑癌特性,推测 DDX1 在宫颈癌发展中可能发挥促癌/抑癌双重作用。谭蓉等^[21]最新研究发现, RNA 解旋酶在肿瘤进展中的促癌/抑癌双重作用是转录活性、DNA 损伤强度和在各种组织中相应修复负荷的综合结果。RNA 解旋酶的异常表达通过转录和 DNA 损伤修复的双重功能障碍引发基因组不稳定性。最重要的是, RNA 解旋酶诱导的基因组不稳定性与肿瘤细胞对铂类化疗药物的敏感性有关^[22],

为 RNA 解旋酶诱导的肿瘤精准治疗提供了线索。DDX1 的双重作用也同样表现在乳腺癌上,临床研究^[23]发现在 DDX1 高表达的乳腺癌患者中,ER-、PR- 较多,且其复发率与死亡率明显高于 DDX1 低表达患者,提示 DDX1 可作为三阴性乳腺癌早期复发风险的一个有价值的生物标志物。Neil K 等^[24]则发现在淋巴结阴性,即未发生远处转移的乳腺癌患者中,DDX1 高表达患者的预后较好。可见,DDX1 在不同类型肿瘤中通过参与 RNA 代谢、DNA 修复、免疫调控以及与关键信号通路的互动,可能以多种方式促进或抑制肿瘤的进展,其具体作用取决于肿瘤类型和微环境的不同效应阶段^[25]。这使得 DDX1 成为一个极具研究价值的癌症治疗靶点。

总之,本研究从体外实验层面揭示了 DDX1 在宫颈鳞癌细胞生物学行为中的作用,其异常表达能显著影响 SiHa 细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移能力。本研究结果能否在体内复杂的肿瘤微环境中重复出一致的结果尚无法肯定,需要在体内动物实验中进一步加以完善,以得到关于 DDX 异常表达在宫颈肿瘤进展过程中更系统、全面的证实。为进一步发现宫颈癌预后评估检查点和精准靶向治疗提供一定理论依据。

参考文献(References)

- [1] 陈艳霞,哈尼克孜·吐尔逊,梁凌云,等.长链非编码 RNA SNHG14/miR-211 对宫颈癌细胞的增殖、侵袭能力的影响[J].现代生物医学进展,2021,21(14):2622-2625,2632.
- [2] Marret G, Borcoman E, Le Tourneau C. Pembrolizumab for the treatment of cervical cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(9): 871-877.
- [3] Zhang X, Wen J, Zhang G, et al. Identification and Validation of Novel Immuno-genic Cell Death- and DNA Damage Response-Related Molecular Patterns Correlated with Immune Status and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2023, 27: 101600.
- [4] Zheng B, Chen X, Ling Q, et al. Role and therapeutic potential of DEAD-box RNA helicase family in colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1278282.
- [5] D'Oronzo S, Silvestris E, Lovero D, et al. DEAD-Box Helicase 4 (Ddx4) + Stem Cells Sustain Tumor Progression in Non-Serous Ovarian Cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6096.
- [6] Liu J, Yang T, Luo Y, et al. DEAD-box helicase 1 inhibited CD8⁺T cell anti-tumor activity by inducing PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(3): 763-776.
- [7] Asberger J, Erbes T, Jaeger M, et al. Endoxifen and fulvestrant regulate estrogen-receptor α and related DEAD box proteins [J]. *Endocr Connect*, 2020, 9(12): 1156-1167.
- [8] Arna AB, Patel H, Singh RS, et al. Synthetic lethal interactions of DEAD/H-box helicases as targets for cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1087989.
- [9] Godbout R, Squire J. Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(16): 7578-7582.
- [10] Tanaka K, Okamoto S, Ishikawa Y, et al. DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes[J]. *Oncogene*, 2009, 28: 2142-2151.
- [11] Tanaka K, Ikeda N, Miyashita K, et al. DEAD box protein DDX1 promotes colorectal tumorigenesis through transcriptional activation of the LGR5 gene[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2479-2489.
- [12] Yuan M, Xu J, Cao S, et al. DDX1 is a prognostic biomarker and correlates with immune infiltrations in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Immunol*, 2022, 23(1): 59.
- [13] Gao B, Li X, Li S, et al. Pan-cancer analysis identifies RNA helicase DDX1 as a prognostic marker[J]. *Phenomics*, 2022, 2(1): 33-49.
- [14] Ashworth A, Lord CJ. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(9): 564-576.
- [15] Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-182.
- [16] Johanneson B, Chen D, Enroth S, et al. Systematic validation of hypothesis-driven candidate genes for cervical cancer in a genome-wide association study [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(9): 2084-2088.
- [17] Bei Y, Bramé L, Kirchner M, et al. Passenger Gene Coamplifications Create Collateral Therapeutic Vulnerabilities in Cancer [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(3): 492-507.
- [18] Wang J, Wang Y, Wang J, et al. DEAD-box helicase 56 functions as an oncogene promote cell proliferation and invasion in gastric cancer via the FOXO1/p21 Cip1/c-Myc signaling pathway[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13970-13985.
- [19] de Amorim JL, Leung SW, Haji-Seyed-Javadi R, et al. The RNA helicase DDX1 associates with the nuclear RNA exosome and modulates R-loops[J]. *bioRxiv*, 2023.04.17.537228. [Preprint]
- [20] Zheng Q, Hou J, Zhou Y, et al. The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m6A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(10): 1094-1103.
- [21] Xie J, Wen M, Zhang J, et al. The Roles of RNA Helicases in DNA Damage Repair and Tumorigenesis Reveal Precision Therapeutic Strategies[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(5): 872-884.
- [22] Yang Q, Xu P, Liu Q, et al. Depleting DDX1 sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy by attenuating cancer stem cell traits[J]. *Life Sci*, 2023, 323: 121592.
- [23] Germain DR, Graham K, Clubrecht DD, et al. DEAD box 1: a novel and in-dependent prognostic marker for early recurrence in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(1): 53-63.
- [24] Taunk NK, Goyal S, Wu H, et al. DEAD box 1 (DDX1) expression predicts for local control and overall survival in early stage, node-negative breast cancer[J]. *Cancer*, 2012, 118(4): 888-898.
- [25] Bohnsack KE, Yi S, Venus S, et al. Cellular functions of eukaryotic RNA helicases and their links to human diseases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 749-769.