

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0115-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250114

沉默DDX39A基因对食管癌TE-1细胞增殖、迁移和侵袭的作用及其机制

武鹏立¹, 李凤玉², 刘博³, 吕洋⁴

(1. 河北北方学院研究生学院, 河北 张家口 075000; 2. 陆军第八十一集团军医院肿瘤内科, 河北 张家口 075000; 3. 河北北方学院附属第一医院病理科, 河北 张家口 075000; 4. 河北北方学院基础医学院病理教研室, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:** 探讨沉默DEAD-box RNA解旋酶39A (DDX39A)对食管癌TE-1细胞增殖、迁移和侵袭的调控作用,并阐明其可能的作用机制。**方法:** 通过基因表达汇编(GEO)数据库下载GSE63941、GSE77861、GSE20347和GSE16153芯片数据,利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库筛选并下载食管癌相关数据;采用R软件分析差异表达基因;通过基因与蛋白质相互作用关系检索工具(String)构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络数据,并采用Cytoscape软件中MCODE插件整合数据,鉴别出相关性强的关键基因,用基因表达谱数据动态分析网页工具(GEPIA 2)分析正常食管黏膜和食管癌组织中关键基因的表达情况,用卡普兰-迈尔曲线图(Kaplan-Meier Plotter)将筛查出来的关键基因进行生存分析并绘图。细胞学实验,选择食管癌TE-1细胞作为研究对象,采用小干扰RNA技术(siRNA)沉默DDX39A基因表达;取对数生长期TE-1细胞,将细胞分为空白组(MOCK组)、阴性对照组(si-NC组)和沉默组(si-DDX39A组);采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和Western blotting法检测各组细胞中DDX39A mRNA及蛋白表达水平,CCK-8法检测各组细胞增殖活性,细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移率,Transwell小室实验检测各组TE-1细胞的侵袭细胞数,Western blotting法检测各组细胞中 β -黏连蛋白(β -catenin)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK3 β)、原癌基因(c-MYC)和细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)及核内 β -catenin蛋白表达水平。**结果:** TCGA数据库与GEO数据库相结合共得到56个差异表达基因。Cytoscape软件MCODE插件共鉴别出41个相关性强的关键基因,通过GEPIA 2和Kaplan-Meier plotter数据库分析41个基因得到DDX39A。RT-qPCR和Western blotting法,与si-NC组比较,si-DDX39A组细胞中DDX39A mRNA和蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。CCK-8法,si-DDX39A组细胞增殖活性低于si-NC组($P < 0.05$);细胞划痕实验,24 h后,si-DDX39A组细胞迁移率低于si-NC组($P < 0.05$);Transwell小室实验,si-DDX39A组侵袭细胞数低于si-NC组($P < 0.05$)。与si-NC组比较,si-DDX39A-1组和si-DDX39A-3组TE-1细胞中 β -catenin、p-GSK3 β 、c-MYC及Cyclin D1以及核内 β -catenin蛋白表达水平均降低($P < 0.01$),而GSK3 β 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** DDX39A基因沉默可以抑制食管癌TE-1细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其作用机制可能与调控Wnt/ β -catenin信号通路有关。

[关键词] 食管肿瘤; DEAD-box RNA解旋酶39A; 生物信息学; 信号通路; 细胞侵袭

[中图分类号] R735.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-03-12 **[录用日期]** 2024-03-22

[基金项目] 河北省科技厅重点研发计划项目卫生健康创新专项(22377765D); 河北省卫健委2024年度医学科学研究指导性课题(20240286); 河北北方学院自然科学基金项目(XJ2023040)

[作者简介] 武鹏立(1998—),女,北京市人,在读硕士研究生,主要从事消化道肿瘤临床病理方面的研究。

[通信作者] 吕洋,教授,硕士研究生导师(E-mail: yyang2bb@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of silencing DDX39A gene on proliferation, migration and invasion of esophageal cancer TE-1 cells and its mechanism

WU Pengli¹, LI Fengyu², LIU Bo³, LYU Yang⁴

(1. Graduate School, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Department of Medical Oncology, Army 81st Group Army Hospital, Zhangjiakou 075000, China; 3. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 4. Department of Pathology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the effect of DEAD-box RNA helicase 39A(DDX39A) gene silencing on the proliferation, migration and invasion of the esophageal cancer TE-1 cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** For bioinformatics analysis, GSE63941, GSE77861, GSE20347, and GSE16153 chip data were downloaded from the GEO database. The esophageal cancer-related data were selected from the TCGA Database. R software was used to analyze the differentially expressed genes. STRING Database was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network. Identification of key genes of high relevance was achieved using the MCODE plugin in Cytoscape. The expression of key genes in normal esophageal tissue and esophageal cancer tissue were analyzed with the GEPIA 2 database. Kaplan-Meier Plotter was used to perform survived analysis and plotting for the screened key genes. Cytological experiments were carried out on esophageal cancer TE-1 cells, and small interfering RNA (siRNA) technology was used to silence the expression of DDX39A gene. The TE-1 cells in the logarithmic growth phase were selected and divided into blank (MOCK) group, negative control (si-NC) group, and silencing (si-DDX39A) group. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of DDX39A mRNA and protein in the TE-1 cells in various groups; CCK-8 assay was conducted to detect the proliferation activity of cells in various groups, and the cell scratch assay was used to measure the migration rate of cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the number of invasion cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of β -catenin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK3 β), c-MYC, Cyclin D1 and nuclear β -catenin proteins in the cells in various groups. **Results:** Analyses using TCGA database combined with the GEO Database yielded a total of 56 differentially expressed genes. MCODE plugin in Cytoscape software identified 41 key genes of high relevance; DDX39A was screened by analyzing 41 genes through the GEPIA 2 and Kaplan-Meier plotter Databases. The results of RT-qPCR and Western blotting methods showed that compared with si-NC group, the expression levels of DDX39A mRNA and protein in the cells in si-DDX39A group were decreased ($P < 0.05$). The CCK-8 results showed that the proliferation activity of the cells in si-DDX39A group was lower than that in si-NC group ($P < 0.05$). The cell scratch assay results showed that the cell migration rate in si-DDX39A group after 24 h was lower than that in si-NC group ($P < 0.05$). The results of Transwell chamber assay showed that the number of invasion cells in si-DDX39A group was lower than that in si-NC group ($P < 0.05$). Compared with si-NC group, the expression levels of β -catenin, p-GSK3 β , c-MYC, Cyclin D1, and nuclear β -catenin in the TE-1 cells in si-DDX39A-1 group and si-DDX39A-3 group were decreased ($P < 0.01$), but the expression levels of GSK3 β protein had no significant differences ($P > 0.05$). **Conclusion:** Silencing of DDX39A gene could inhibit the proliferation, migration and invasion of TE-1 cells, and the mechanism may be related to the regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS Esophageal neoplasms; DEAD-box RNA Helicase 39A; Bioinformatics; Signaling pathway; Cell invasion

食管癌是全球最常见的癌症之一^[1]。在我国, 食管癌也属于高发的消化道系统肿瘤, 其发病率和致死率分别位于消化系统肿瘤的第6位及第4位^[2], 且在食管癌发病后期尚未有能够显著提高患者生存质量的治疗措施, 进而影响患者的预后^[3-5]。因此, 探索食管癌的发生发展机制并寻找新的诊疗靶标是近年来研究的重点。DEAD-box RNA 解旋酶 39A (DEAD-box RNA helicase 39A, DDX39A) 是 RNA 解旋酶 DEAD-box 家族成员之一, 其在免疫识别、信号通路调控和 RNA 转录与剪切等方面发挥重要作用^[6]。研究^[7-9]显示: DDX39A 在黑色素瘤、肾癌和肺癌等多种恶性肿瘤组织中异常表达, 且与肿瘤的强侵袭性和低生存率存在关联。目前, DDX39A 在食管癌恶性进展过程中的作用及其相关机制尚未见相关报道。本研究探讨沉默 DDX39A 基因表达对食管癌 TE-1 细胞增殖、迁移和侵袭的作用及其对 Wnt/ β -黏连蛋白 (β -catenin) 信号通路的影响, 并阐明其作用机制, 为食管癌的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人食管癌 TE-1 细胞购于中国科学院上海细胞库。DDX39A siRNA 及阴性对照 siRNA 由和元生物技术 (上海) 股份有限公司合成, Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 多克隆抗体 DDX39A、单克隆抗体原癌基因 (c-MYC) 和单克隆抗体细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 购于武汉 ABclonal 公司, 单克隆抗体 β -catenin、GAPDH、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)、磷酸化 GSK3 β (phosphorylated GSK3 β , p-GSK3 β) 和 LaminB1 购于杭州华安生物技术有限公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、Transwell 小室和 RPMI 1640 培养基购于以色列 Biolnd 公司, Opti-MEMTM (减血清) 培养基购于澳大利亚 Gibco 公司, CCK-8 试剂购于河北瑞帕特生物科技有限公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒购于天津中实同创公司。倒置荧光显微镜 (型号: TI-FL) 购于日本 Nikon 公司, CO₂ 恒温培养箱 (型号: 3111)、VarioskanTM LUX 多功能微孔板读数仪 (型号: VL0L00D0)、PCR 仪 (型号: Veriti) 和 RT-qPCR 仪 (型号: TCR0096) 购于美国 Thermo 公司, 电泳仪 (型号: DYY-4C) 购于北京六一生物科技有限公司。

1.2 生物信息学资料收集与分析 从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中下载 162 例食管癌和 11 名正常人的基因表达数据, 采用 R 语言 DESeq2 包进行差异分析, 以调整后的 P 值 ($\text{adj. } P < 0.05$, $|\log$ 差异倍数 (FC)| > 1 为筛选条件, 得到差异表达的基因; 在基因表达汇编 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库中下载 GSE63941、GSE77861、GSE20347 和 GSE16153 的基因表达数据集, 以 $\text{adj. } P < 0.05$, $|\log$ FC > 1 为筛选条件, 通过 GEO 数据库自带在线分析工具 GEO2R 分析每一个数据集, 得到差异表达基因; 通过基因与蛋白质相互作用关系检索工具 (STRING) 构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络数据, 并采用 Cytoscape 软件中 MCODE 插件整合数据, 鉴别出相关性强的关键基因; 通过基因表达谱数据动态分析网页工具 (GEPIA 2) 分析工具 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) 分析 DDX39A 在食管癌中 mRNA 表达情况; 利用 Kaplan-Meier 生存曲线图 (Kaplan-Meier plotter) (<https://www.kmplot.com/analysis/>) 数据库分析 DDX39A 蛋白表达水平与食管癌患者预后的相关性。

1.3 细胞培养、分组和转染 将人食管癌 TE-1 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行培养。将其置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 观察细胞状态, 使其正常生长。当 TE-1 细胞处于对数生长期时, 将其接种于 6 孔细胞培养板中, 当细胞密度达到 75%~80% 时, 将其分为空白对照组 (MOCK 组)、阴性对照组 (si-NC 组) 和沉默组 (si-DDX39A 组)。依据 Lipofectamine 2000 试剂盒的说明书分别进行不同片段的转染。MOCK 组未做处理组, si-NC 组转染阴性对照 siRNA, si-DDX39A 组根据转染不同的沉默片段分为 si-DDX39A-1 组、si-DDX39A-2 组和 si-DDX39A-3 组。转染 6 h 后换含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养, 转染 48 h 内, 采用 RT-qPCR 法测定 TE-1 细胞中 DDX39A mRNA 表达水平; 转染 72 h 内, 采用 Western blotting 法测定中 TE-1 细胞中 DDX39A 蛋白表达水平。

1.4 Western blotting 法检测各组 TE-1 细胞中 DDX39A 蛋白表达水平 将各组处于对数生长期细胞, 按比例在 RIPA 裂解液中加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂, RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min, 4 °C、20 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清液, 提取细胞蛋白。使用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid,

BCA)法检测各组蛋白浓度。然后以1:4的比例将SDS缓冲液与提取的上清液混合,将其煮沸。将各组分别取10 μg蛋白上样,利用10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行电泳分离,再转膜至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。用5%的脱脂牛奶在摇床上室温封闭1 h后,采用DDX39A抗体(1:1 000)4℃孵育过夜;在加入相应的二抗(1:10 000)摇床上室温孵育1 h,用TBST溶液冲洗3次,每次8 min。在膜上均匀滴加ECL发光液,然后用显影仪进行显影、曝光,得到图像,采用Image J软件进行灰度值分析,以GAPDH为内参计算各组TE-1细胞中DDX39A蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.5 RT-qPCR法检测各组TE-1细胞中DDX39A mRNA表达水平 将各组细胞培养转染48 h内,使用RNA提取试剂盒提取细胞的RNA,进行cDNA逆转录,之后进行Real-time PCR扩增,检测DDX39A mRNA表达水平。Real-time PCR反应采用两步法。第一步:95℃、5 min;第二步:95℃、10 s, 60℃、20 s, 40个循环。DDX39A引物序列:正向引物,5'-GATTGAGCCTGTCAACGGACAG-3';反向引物,5'-GATGGAGAGACCACCGAAGA-AC-3'。以GAPDH为内参比较RT-qPCR扩增的程度。以GAPDH作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算DDX39A mRNA表达水平。

1.6 CCK-8法检测各组TE-1细胞增殖活性 转染48 h后,取各组数量相等的细胞,接种于96孔细胞培养板中(每孔 3×10^3 个细胞),分别于培养0、24、48和72 h后,配置含10% CCK-8的培养基以换液的形式加入96孔细胞培养板中,培养2 h后,用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A)值,并绘制细胞增殖曲线,以A值代表细胞增殖活性。

1.7 细胞划痕实验检测各组TE-1细胞迁移率 各组细胞转染48 h后接种于6孔细胞培养板中(每孔 1×10^5 个细胞)培养24 h,融合度大于90%时;用200 μL的枪头尖端在融合的单层上进行划痕,并加入不含FBS的培养基进行培养;划痕后0~24 h内,在光学显微镜下记录细胞的图像,采用Image J软件计算划痕部位的迁移面积,并计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h

划痕面积 $\times 100\%$,划痕愈合率即为细胞迁移率。

1.8 Transwell小室实验检测各组TE-1细胞的侵袭细胞数 各组细胞转染48 h后,用无血清RPMI 1640重悬细胞,分别取各组相同数量的细胞(每孔 5×10^4 个细胞)接种于Transwell小室的上室,下室加入500 μL的RPMI 1640+10% FBS培养基,置于细胞培养箱中培养。48 h后将小室取出,用多聚甲醛固定并用0.1%结晶紫染色;使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗并晾干后,拍照并随机选取5个视野进行细胞计数,5个视野侵袭细胞数的均值代表细胞的侵袭能力。侵袭实验前以1:8比例将无血清RPMI 1640与基质胶混合,铺于Transwell小室上室,放在培养箱中使其形成薄膜。培养48 h后,结晶紫染色,显微镜拍照并随机选取5个视野进行细胞计数,5个视野侵袭细胞数的均值代表细胞的侵袭能力,以上实验每组重复3次。

1.9 Western blotting法检测各组TE-1细胞中β-catenin、p-GSK3β、GSK3β、c-MYC和Cyclin D1及核内β-catenin蛋白表达水平 各组细胞转染72 h后,分别提取各组细胞的蛋白,Western blotting法检测各组TE-1细胞中β-catenin、p-GSK3β、GSK3β、c-MYC和Cyclin D1及核内β-catenin蛋白表达水平。方法同“1.4”。其中核内β-catenin蛋白表达水平=核内β-catenin蛋白条带灰度值/LaminB1蛋白条带灰度值,以LaminB1为内参。β-actin、p-GSK3β、GSK3β、c-MYC和Cyclin D1一抗浓度为1:1 000,二抗浓度为1:10 000。

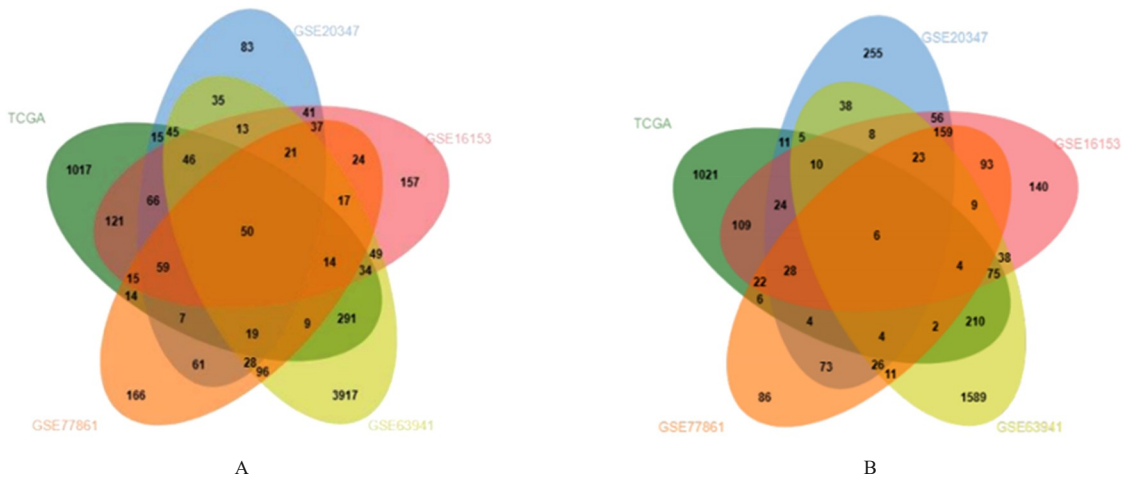
1.10 统计学分析 采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性、细胞迁移率、侵袭细胞数和DDX39A mRNA表达水平,TE-1细胞中DDX39A、β-actin、p-GSK3β、GSK3β、c-MYC和Cyclin D1及核内β-catenin蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验;2组间样本均数比较采用两独立样本*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌生物信息学分析结果 在TCGA数据库中下载关于食管癌组织的基因集,分析162例食管癌患者食管癌组织和11名正常人食管组织中的差异表达基因,结合GEO数据库的验证,通过交互式维恩图分析得到的数据集中的14 222个差

异表达基因, 其中共同差异表达基因有 50 个上调基因和 6 个下调基因用于后续分析 (图 1)。利用 Cytoscape 分析软件整合 PPI 网络数据并进行可视化分析, 用其 MCODE 插件鉴别相关性强的关键基因有 41 个 (图 2); 利用 GEPIA 2 在线数据库对食管癌

的差异表达基因进行差异分析, 结果显示: DDX39A 基因在肿瘤组织中的表达水平高于正常组织 (图 3A); 利用 Kaplan-Meier plotter 数据库绘制 DDX39A 表达的生存曲线, 结果显示: DDX39A 高表达食管癌患者的生存率低 (图 3B)。



A: Up-regulated differential expression genes; B: Down-regulated differential expression genes.

图 1 食管癌的差异表达基因维恩图

Fig. 1 Venn diagram of differential expression genes for esophageal cancer

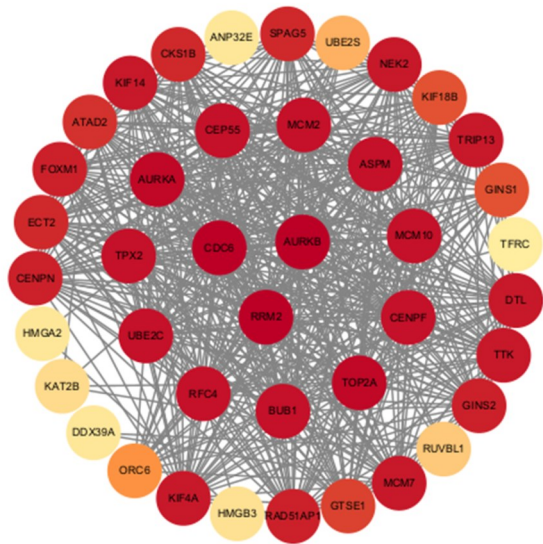


图 2 食管癌的关键基因可视化图

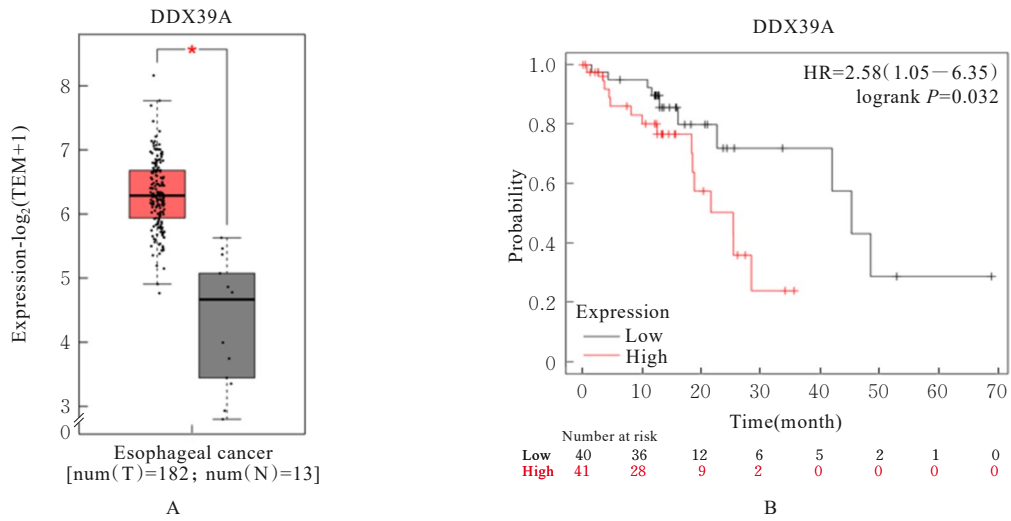
Fig. 2 Visualization of key genes for esophageal cancer

2.2 各组 TE-1 细胞中 DDX39A mRNA 和蛋白表达水平 与 MOCK 组和 si-NC 组比较, si-DDX39A-1 组、si-DDX39A-2 组和 si-DDX39A-3 组 TE-1 细胞中 DDX39A mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 MOCK 组和 si-NC 组比较, si-DDX39A-1 组和 si-DDX39A-3 组 TE-1 细胞中 DDX39A 蛋白表达

水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 si-DDX39A-2 组 TE-1 细胞中 DDX39A 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MOCK 组和 si-NC 组 TE-1 细胞中 DDX39A mRNA 及蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此选取 si-NC 组、si-DDX39A-1 组和 si-DDX39A-3 组的 TE-1 细胞进行后续实验。见表 1 和图 4。

2.3 各组细胞增殖活性 CCK-8 法检测结果显示: 细胞初接种至 96 孔细胞培养板为 0 h, 各组细胞的增殖活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 48 和 72 h 时, 与 si-NC 组比较, si-DDX39A-1 组和 si-DDX39A-3 组 TE-1 细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.4 各组 TE-1 细胞迁移率和侵袭细胞数 与 si-NC 组 ($60.54\% \pm 3.52\%$) 比较, si-DDX39A-1 组 ($10.27\% \pm 1.34\%$) 和 si-DDX39A-3 组 ($12.54\% \pm 1.55\%$) TE-1 细胞迁移率明显降低 ($P < 0.01$)。见图 6。Transwell 小室实验检测结果显示: 与 si-NC 组 ($158.66 \text{ 个} \pm 6.44 \text{ 个}$) 比较, si-DDX39A-1 组 ($41.20 \text{ 个} \pm 4.33 \text{ 个}$) 和 si-DDX39A-3 组 ($32.66 \text{ 个} \pm 5.55 \text{ 个}$) TE-1 细胞侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.01$)。见图 7。



A: GEPIA database analysis of DDX39A mRNA expression; B: Survival curves of adverse progression of DDX39A.

图3 食管癌组织与正常食管组织中DDX39A基因的差异分析及生存分析

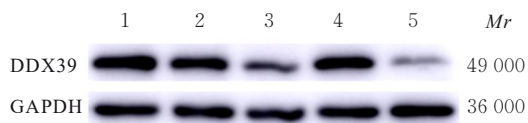
Fig. 3 Differential analysis and survival analysis of DDX39A gene in normal esophageal tissue and esophageal cancer tissue

表1 各组TE-1细胞中DDX39A mRNA和蛋白表达水平

Tab. 1 Expression levels of DDX39A mRNA and protein in TE-1 cells in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	DDX39A mRNA	DDX39A protein
MOCK	1.00±0.02	1.05±0.02
si-NC	1.06±0.07	0.93±0.05
si-DDX39A-1	0.20±0.03 [△]	0.61±0.05 [△]
si-DDX39A-2	0.28±0.03 [△]	0.98±0.06
si-DDX39A-3	0.15±0.03 [△]	0.49±0.03 [△]

*P<0.05 vs MOCK group; [△]P<0.05 vs si-NC group.



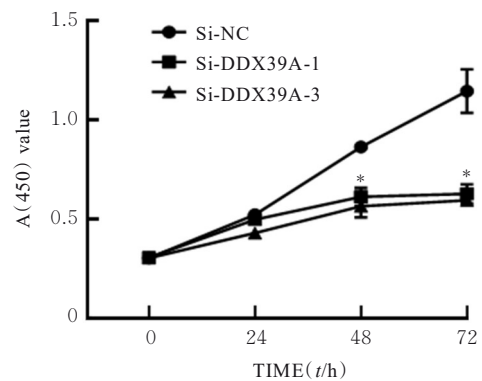
Lane 1: MOCK group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-DDX39A-1 group; Lane 4: Si-DDX39A-2 group; Lane 5: Si-DDX39A-3 group.

图4 各组TE-1细胞中DDX39A蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expression of DDX39A in TE-1 cells in various groups

2.5 各组TE-1细胞中β-catenin、p-GSK3β、GSK3β、c-MYC、Cyclin D1和核内β-catenin蛋白表达水平

与si-NC组比较, si-DDX39A-1组和si-DDX39A-3组TE-1细胞中β-catenin、Cyclin D1、c-MYC和p-GSK3β及核内β-catenin蛋白表达水平明显降低(P<0.01), 而GSK3β蛋白表达水平差异无统计学



*P<0.01 vs si-NC group.

图5 CCK-8法检测各组TE-1细胞增殖活性

Fig. 5 Proliferation activities of TE-1 cells in various groups detected by CCK-8 method

意义(P>0.05)。见图8和9。

3 讨论

由于食管癌发生发展的机制十分复杂, 目前手术治疗和放疗等传统疗法在食管癌治疗及预后等方面均具有局限性^[10]。而分子靶向治疗是当前研究的热点, 其为食管癌的治疗提供了新的可能性。如何找到能用于早期诊断和治疗的靶点是当前研究的重点。本研究以食管癌TE-1细胞为研究对象, 通过沉默细胞中DDX39A基因, 研究Wnt/β-catenin信号通路相关信号靶蛋白的表达, 观察细胞增殖、迁移和侵袭能力, 并探讨其可能的作用机制。本研

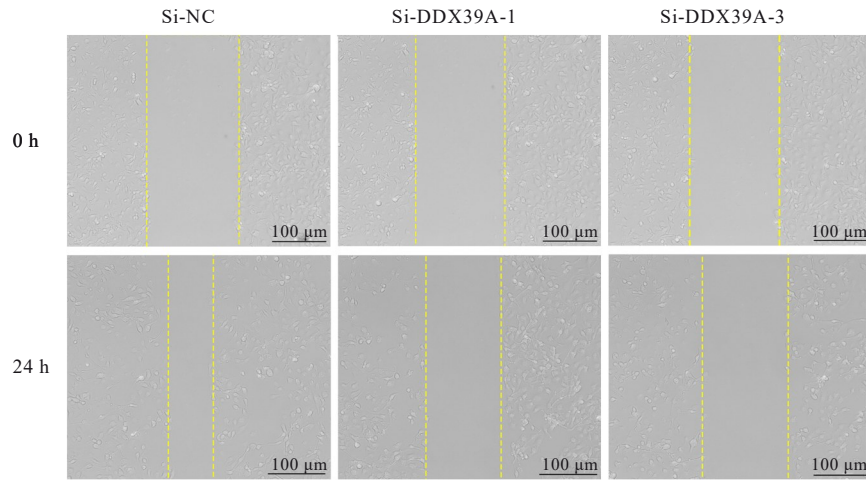
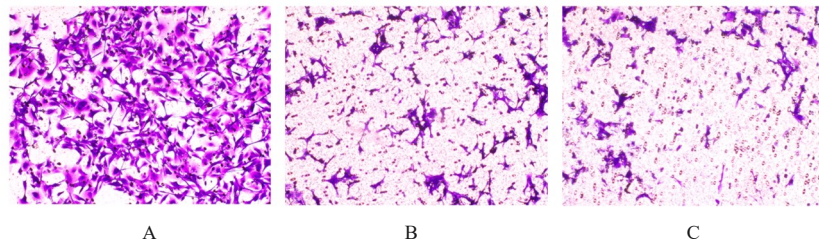


图 6 各组 TE-1 细胞迁移情况

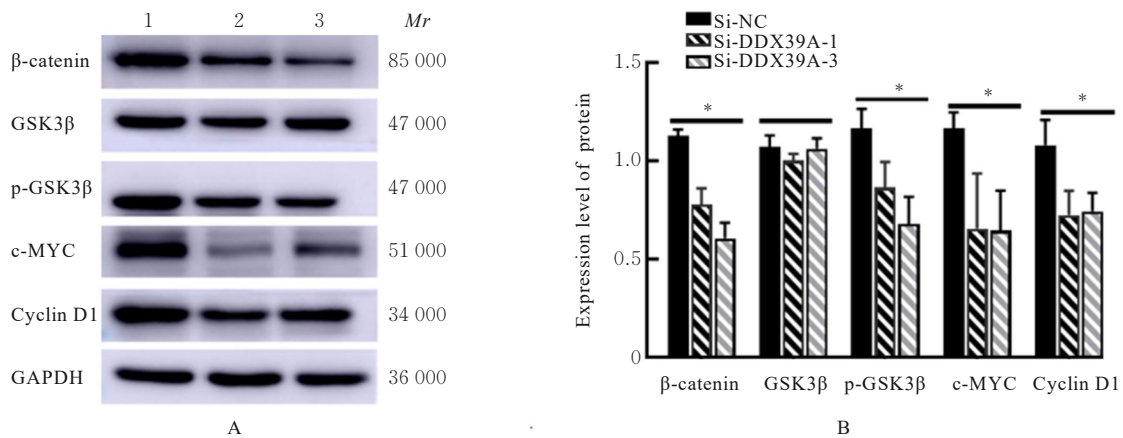
Fig. 6 Migration of TE-1 cells in various groups



A: Si-NC group; B: Si-DDX39A-1 group; C: Si-DDX39A-3 group.

图 7 各组 TE-1 细胞侵袭情况(结晶紫, ×200)

Fig. 7 Invasion of TE-1 cells in various groups(Crystal violet, ×200)



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: Si-DDX39A-1 group; Lane 3: Si-DDX39A-3 group. * $P < 0.01$.

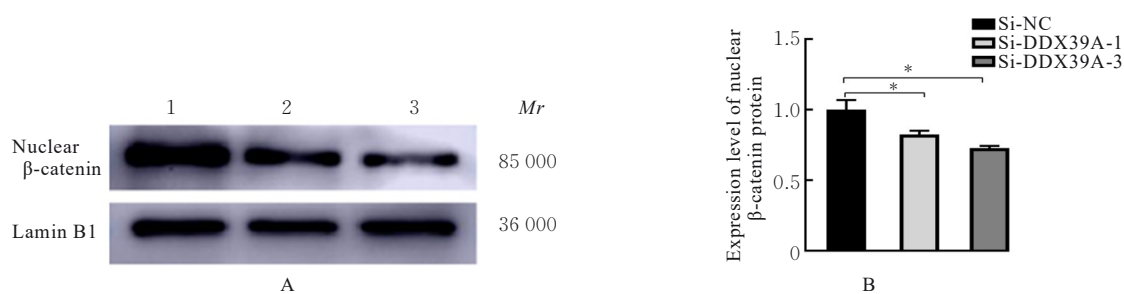
图 8 各组 TE-1 细胞中 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 、c-MYC 和 Cyclin D1 的蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , c-MYC, and Cyclin D1 proteins in TE-1 cells in various groups

究结果显示：转染 siRNA 可降低 TE-1 细胞中 DDX39A mRNA 和蛋白表达水平，沉默 DDX39A 基因可抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力，其可能通过抑制 β -catenin 的核易位，减少

β -catenin 表达，进而抑制下游 c-MYC 和 Cyclin D1 蛋白的表达，从而影响 Wnt/ β -catenin 信号传导。

DDX39A 是一种以三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖性方式解开双链 RNA 的



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: Si-DDX39A-1 group; Lane 3: Si-DDX39A-3 group. * $P < 0.01$.

图9 各组 TE-1 细胞中核内 β -catenin 的蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 9 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of nuclear β -catenin in TE-1 cells in various groups

DEAD box RNA 解旋酶, 其可调控 RNA 的转录、剪接、输出、核糖体生物发生、端粒保护和翻译等多个方面^[11-12]。研究^[13]表明: DEAD box 蛋白参与细胞增殖或肿瘤转化的关键过程, 包括肿瘤细胞生长、细胞周期控制、细胞凋亡、RNA 易位、细胞骨架重排和细胞迁移。研究^[14]显示: DDX39A 在多种肿瘤组织中高表达, 在乳腺癌中 DDX39A 高表达与其肿瘤的发生和预后不良存在密切关联, 沉默 DDX39A 基因可抑制人乳腺癌 MCF7 细胞的增殖和侵袭能力。DDX39A 表达升高导致胃癌患者预后不良^[15]; 研究^[16]显示: 在肝细胞癌中, 沉默 DDX39A 基因的表达可抑制人肝癌细胞 Huh1 和 Hep3B 的迁移和侵袭能力, 沉默 DDX39A 可抑制 β -catenin 在细胞核中的积累以及抑制 Wnt 信号传导, 其机制可能是 DDX39A 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号传导, 从而抑制肝癌的恶性发展。

Wnt/ β -catenin 信号传导失调已被证实与恶性肿瘤的发生有关^[17]。激活的 Wnt/ β -catenin 信号传导促进细胞增殖和肿瘤干细胞更新, 在恶性表型的发展中具有重要作用^[18]。p-GSK3 β 是 Wnt 通路的关键调节因子, 通过影响 β -catenin 参与调控细胞增殖和凋亡^[19-20]。 β -catenin 是 Wnt 通路的关键组成部分^[21-22], 其可作为黏附结合蛋白和转录辅助调节因子发挥作用, 与细胞黏附有关^[23]。研究^[24-25]显示: Wnt/ β -catenin 信号通路参与食管癌的发生发展, 是通过将 β -catenin 转运到细胞核中与 T 细胞因子 (T-cell factor, TCF) 和淋巴细胞增强因子 (lymphoid enhancer factor, LEF) 家族转录因子结合, 激活 Wnt 靶基因的转录从而促进癌症的转移。c-MYC 和 Cyclin D1 基因会被 β -catenin 激活, 使 c-MYC 和 Cyclin D1 的蛋白表达水平升高。Cyclin D1 是一种与细胞周期调节相关的蛋白质, 可作为细胞周期蛋白依赖性激酶的调节剂。Cyclin D1

的扩增或过表达会改变细胞周期进程并导致肿瘤发生, 而 c-MYC 可调控细胞周期 S 期, 影响细胞周期从而调控肿瘤细胞的增殖^[26-28]。ZHANG 等^[16]研究显示: DDX39A 过表达与 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。本研究结果显示: 沉默 DDX39A 后 TE-1 细胞 β -catenin、pGSK-3 β 、c-MYC 和 Cyclin D1 蛋白表达水平均降低。沉默 DDX39A 抑制 β -catenin 的核易位, 使核内 β -catenin 蛋白表达水平降低。

综上所述, 沉默 DDX39A 基因可抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 其可能是通过靶向抑制 β -catenin 表达, 进而抑制下游靶蛋白 c-MYC 和 Cyclin D1 来实现的, 靶向 DDX39A 可为食管癌的治疗提供新的思路。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

武鹏立参与实验设计和论文撰写, 李凤玉参与数据统计分析, 刘博参与论文审阅和论文修改, 吕洋参与实验设计和指导。

[参考文献]

- [1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
- [2] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590.
- [3] MORGAN E, SOERJOMATARAM I, RUMGAY H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020 [J]. Gastroenterology, 2022,

- 163(3): 649-658.
- [4] 王立东, 蒋宁宁, 马磊, 等. 营养状况对中国食管癌疾病谱和精准防控策略的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2024, 59(5): 593-597.
- [5] 方金梅, 赵于飞, 龙腾飞, 等. 基于美国国家癌症研究所监测、流行病学、结果数据库食管癌病人预后影响因素分析[J]. 安徽医药, 2022, 26(3): 475-480.
- [6] GUSTAFSON E A, WESSEL G M. DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(1): 1-6.
- [7] SUGIURA T, NAGANO Y, NOGUCHI Y. DDX39, upregulated in lung squamous cell cancer, displays RNA helicase activities and promotes cancer cell growth [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(6): 957-964.
- [8] BAO Y W, JIANG A M, DONG K, et al. DDX39 as a predictor of clinical prognosis and immune checkpoint therapy efficacy in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(12): 3158-3172.
- [9] XING C J, TIAN H, ZHANG Y N, et al. DDX39 overexpression predicts a poor prognosis and promotes aggressiveness of melanoma by cooperating with SNAIL [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1261.
- [10] 齐英男, 麦秀滢, 姜晓勃, 等. 食管癌个体化临床靶区-计划靶区外扩边界剂量研究及摆位误差分析[J]. 中国医学物理学杂志, 2023, 40(12): 1453-1458.
- [11] SUGIURA T, SAKURAI K, NAGANO Y. Intracellular characterization of DDX39, a novel growth-associated RNA helicase [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(4): 782-790.
- [12] GROMADZKA A M, STECKELBERG A L, SINGH K K, et al. A short conserved motif in ALYREF directs cap-and EJC-dependent assembly of export complexes on spliced mRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(5): 2348-2361.
- [13] WEN X H, ZHANG S F, ZHANG Y A. Research progress in DEAD-box family protein in cancer [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017, 42(11): 1311-1315.
- [14] WANG X D, LI P P, WANG C Y, et al. DEAD-box RNA helicase 39 promotes invasiveness and chemoresistance of ER-positive breast cancer [J]. *J Cancer*, 2020, 11(7): 1846-1858.
- [15] 熊建新, 于立丽. DDX39在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(5): 366-368.
- [16] ZHANG T, MA Z J, LIU L J, et al. DDX39 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 675.
- [17] WU Z L, CHEN Y J, ZHANG G Z, et al. SKI knockdown suppresses apoptosis and extracellular matrix degradation of nucleus pulposus cells via inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway and ameliorates disc degeneration [J]. *Apoptosis*, 2022, 27(1/2): 133-148.
- [18] ZHANG Y, WANG X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165.
- [19] CHEN Z Y, DU Y, WANG L, et al. MiR-543 promotes cell proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by targeting Dickkopf 1 through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2018, 9(20): 3660-3668.
- [20] LIN Y B, CHEN X, LIN L P, et al. Sesamol serves as an MYH14 inhibitor to sensitize endometrial cancer to chemotherapy and endocrine therapy via suppressing MYH9/GSK3 β / β -catenin signaling [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 63.
- [21] YU F Y, YU C H, LI F F, et al. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 307.
- [22] 顾嘉伟, 牛耿明, 柯重伟. 经典Wnt信号通路中 β -catenin在细胞核内外分布的调控机制及潜在治疗靶点的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2022, 49(2): 300-308.
- [23] WANG B Q, LI X P, LIU L, et al. β -Catenin: oncogenic role and therapeutic target in cervical cancer [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 33.
- [24] XU Q X, LI X Z, LI Y, et al. Kinesin family member 23 knockdown inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in esophageal carcinoma by inactivating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Funct Integr Genomics*, 2023, 23(2): 154.
- [25] LIU H J, LIU Y, ZHOU Y J, et al. TM7SF2-induced lipid reprogramming promotes cell proliferation and migration via CPT1A/Wnt/ β -Catenin axis in cervical cancer cells [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 207.
- [26] LECARPENTIER Y, SCHUSSLER O, HÉBERT J L, et al. Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1248.
- [27] 罗刚, 谢敏慧, 杨娟, 等. REG γ 通过Wnt/ β -catenin信号通路影响胃癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(21): 5285-5289.
- [28] KATO M, KATO M. WNT signaling and cancer stemness [J]. *Essays Biochem*, 2022, 66(4): 319-331.