

网络出版时间:2024-09-25 10:00:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1713.010

DDX5 对白血病 K562 细胞生物学功能的影响及其机制

胡爽¹,陈晓冉²,冯钰斌³

[¹ 安徽医科大学药学院,合肥 230032;² 安徽中医药大学药学院,合肥 230013;³ 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药学部、精准药物制剂与临床药学安徽省重点实验室,合肥 230001]

摘要 目的 探讨 DDX5 解螺旋酶对白血病细胞系 K562 细胞增殖、凋亡和分化的影响。方法 利用癌症基因数据库 GEPIA 中的数据分析 DDX5 mRNA 在白血病患者组织中的表达;生存曲线分析 DDX5 mRNA 表达水平与白血病患者预后关系;采用小干扰 RNA (siRNA) 瞬时转染 K562 细胞以敲低 DDX5;使用实时荧光定量 (RT-PCR) 检测沉默效果;采用 Western blot 检测蛋白表达水平;采用 CCK-8 实验检查细胞增殖能力、采用 Western blot 和免疫荧光检测细胞增殖相关蛋白的表达水平;采用流式细胞术检测细胞凋亡;采用流式细胞术和 Western blot 检测细胞分化相关蛋白的表达水平。最后,通过 RT-PCR 和 Western blot 检测沉默 DDX5 对 P21 和 P53 蛋白表达水平的影响。**结果** GEPIA 数据库分析结果显示 DDX5 在人白血病骨髓组织中的表达水平显著高于健康人群,低表达 DDX5 的患者具有更长的生存期。体外实验表明敲低 DDX5 可显著抑制 K562 细胞的增殖,流式细胞术检测结果表明可以促进细胞凋亡、促进 CD11b 和 CD14 蛋白的表达诱导细胞分化。沉默 DDX5 促进 P21 和 P53 蛋白的表达水平。**结论** DDX5 可能通过靶向 P53 抑制白血病细胞系 K562 细胞增殖,促进凋亡诱导分化。

关键词 K562 细胞;DDX5;细胞增殖;凋亡;细胞分化;P53

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1557-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.010

白血病是一种高发性且预后不佳的血液系统恶性肿瘤,因其极高的病死率在临床上备受关注^[1]。DDX5 解螺旋酶 (DEAD-box RNA helicases) 作为一种关键的 ATP 依赖性 RNA 解旋酶,广泛介入基因表达的多个关键环节,涵盖了 RNA 的处理(如剪接、转运与翻译)^[2-3]、DNA 复制流程^[4]、核糖体与 miRNA 的生物合成,以及转录调控的精细调节^[5]。值得注意的是,在肿瘤环境中,DDX5 的翻译后修饰模式常发生显著变化,这些变化被视为 DDX5 过度表达的重要驱动力,涵盖了泛素化、类泛素化及磷酸化等多种机制,并与肿瘤细胞的恶性转化及生存能力密切相关^[6]。现有研究^[7-8]进一步揭示了 DDX5 在促进肿瘤侵袭与转移中的关键作用,特别是它在加速肺腺癌、食管癌等肿瘤细胞上皮-间质转化进程中的角色。在肝癌细胞中抑制 DDX5 的表达,可有效阻断上皮-间质转化过程,为肿瘤治疗提供了新的思路。但是 DDX5 在白血病中的作用,至今尚

不清楚。该研究首先利用 GEPIA 数据库对 DDX5 在白血病中的表达以及临床意义进行相关性分析,再通过体外实验分析 DDX5 对 K562 细胞增殖、凋亡和分化的影响,以及 DDX5 对 P21 和 P53 蛋白的调控作用,阐明 DDX5 在白血病发生和发展过程中的调控作用及其机制,为白血病的诊断和治疗提供新的靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人白血病细胞系 K562 细胞由中国科学院上海生命科学院细胞库提供。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清及双抗均购自美国 Gibco 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒、蛋白质定量检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自中国上海贝博生物科技有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自上海赛默飞世尔科技有限公司;SYBR Green 荧光定量试剂盒购自美国 Kapa Biosystems 公司;兔种属来源二抗、鼠种属来源二抗均购自武汉亚科因生物科技有限公司;增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、 β -actin、CD11b、CD14、DDX5、P21、P53 抗体购自英国 Abcam 公司。

2024-08-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82300177);安徽省重点研究与开发计划(编号:2022e07020010)

作者简介:胡爽,女,硕士研究生;

冯钰斌,男,助理研究员,通信作者,E-mail:fengyubin@ustc.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 临床相关性分析 本研究利用 GEPIA 平台 (网址: <http://gepia.cancer-pku.cn/detail>), 从 TCGA 和 GTEx 项目中获取 RNA-seq 数据, 通过 Wilcoxon 检验对比分析了 DDX5 基因在癌症组织及其邻近正常组织中的表达水平差异。

1.2.2 细胞培养 人白血病细胞系 K562 细胞分别培养在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 μg/ml 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基中, 置于含 5% CO₂、37 °C 培养箱中传代培养。

1.2.3 siRNA 转染 将设计好的用于靶向沉默 DDX5 的 siRNA 与 Lipofectamine 2000 载体混合孵育 20 min 后, 添加到 K562 细胞培养皿中。同时, 设立 si-NC (非特异性 siRNA) 转染的细胞作为阴性对照组, 而 si-DDX5 转染的细胞则为实验组。在转染 6~8 h 后更换为完全培养基, 随后收集这些细胞以供后续实验使用。

1.2.4 细胞总蛋白的提取与 Western blot 实验 收集细胞样本后, 加入匹配的细胞裂解溶液, 在恒温振荡器中温和裂解 30 min。随后, 在 4 °C 条件下以 12 000 r/min 的转速离心 20 min, 分离出上清液作为后续分析的蛋白样品。利用蛋白定量试剂盒精确测定上清液中的蛋白浓度。接着, 将蛋白样品与等体积的加样缓冲液混合, 并通过沸水加热 10 min 以实现蛋白变性。之后, 采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳技术分离蛋白, 并通过半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上。膜上蛋白先与一抗 (稀释比例 1:1 000) 在低温下孵育过夜, 次日再与二抗 (同样稀释比例 1:1 000) 在室温下孵育。利用 ECL 化学发光法进行显色处理, 并通过曝光记录结果。最后, 运用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量分析, 计算目标条带与 β-actin 内参条带的灰度比值, 以评估目标蛋白的相对表达水平。

1.2.5 总 RNA 的提取与 qRT-PCR 实验 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 测定 RNA 样品浓度并进行逆转录。实时定量 PCR 反应体系在 96 孔板中充分混匀, 置于荧光定量 PCR 仪上进行反应, 每组设 3 个复孔, 以 β-actin 为内参进行定量分析, 引物序列见表 1。

1.2.6 细胞活力检测 CCK-8 法检测接种于 96 孔板中处于对数生长期的细胞, 分别在 24、48、72、96 h 加入 10 μl CCK-8 试剂原液, 37 °C 孵育 1 h 后, 收集 90 μl 反应液, 用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.2.7 流式细胞术检测细胞分化 收取经处理后

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer names	Sequences(5' - 3')
DDX5	F: AGCAAGTGAGCGACCTTATC
	R: CATCCTTCATGCCTCCTCTAC
GAPDH	F: CCCTTCATTGACCTCAACTACA
	R: ATGACAAGCTTCCCGTTCTC
P53	F: ATCTGTGACGAACGTCACC
	R: CCTTCATCCTCATCCTTGTCTTC
P21	F: CAGCTCAGGACTGGAAGG
	R: TCCGGAGGGTCTCGTAAGAT

的各组细胞, 每组细胞量不少于 1×10^5 个, 用 100 μl PBS 溶液重悬细胞, 加入 CD11b 抗体和 CD14 抗体, 室温下避光孵育 15 min, 之后 PBS 洗 3 次, 重悬于 300 μl PBS 中, 混合均匀后用流式细胞仪进行检测。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期 收取经处理后的各组细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液, 收集各组细胞, PBS 清洗后, 1 000 r/min 离心 5 min 去除 PBS, 加入 70% 乙醇溶液固定细胞, 4 °C 下固定过夜; 1 000 r/min 离心 5 min 去除上清液, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 5 μl PI (浓度为 1 mg/ml) 和 1 μl RNase A (浓度为 1 mg/ml), 避光孵育 30 min, 立即上流式细胞仪检测细胞周期变化。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 收取经处理后的各组细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液, 收集各组细胞, PBS 清洗后, 1 000 r/min 离心 5 min 去除 PBS, 再加入 100 μl Binding Buffer、2.5 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI 重悬细胞, 室温避光孵育 15 min, 在 1 h 内上机进行流式检测。采用 FlowJo 7.6 软件分析数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 和 ImageJ 软件分析数据, 采用 Graph Pad Prism 9 软件进行图表绘制。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 Tukeys HSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDX5 在白血病患者骨髓组织中的表达 对 GEPIA 平台中来自 TCGA 和 GTEx 项目的癌组织和相应癌旁组织的 RNA-seq 表达数据进行分析, 探究 DDX5 的表达水平。结果显示, DDX5 在 AML 患者骨髓组织中的 mRNA 表达水平高于健康人群 ($P < 0.05$), 见图 1A。此外, 低表达 DDX5 的患者具有更长的生存期, 见图 1B。因此, 推测 DDX5 可能在白

血病中发挥促癌基因的功能。

2.2 DDX5 敲低细胞株的鉴定 Western blot 和 qRT-PCR 实验结果显示,成功筛选了瞬时敲低 DDX5 的 K562 细胞株,与 si-NC 组比较,si-DDX5 组中 DDX5 的蛋白表达水平 ($F = 34.795$, $P < 0.05$) 和 mRNA ($F = 32.56$, $P < 0.05$) 表达水平敲减率均达 50% 左右,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 DDX5 对 K562 细胞增殖的影响 CCK-8 实验结果显示,敲低 DDX5 可以显著抑制 K562 细胞的增殖能力,见图 3A (72 h: $F = 37.567$, $P < 0.05$; 96 h: $F = 109.914$, $P < 0.05$)。PCNA 和 KI67 是增殖

标志性蛋白,结果如图 3B 显示,与 si-Ctrl 组相比,si-DDX5 组细胞中 PCNA 蛋白表达量降低,差异有统计学意义 ($F = 114.868$, $P < 0.01$)。免疫荧光结果显示,与 si-NC 组相比,si-DDX5 组细胞免疫荧光强度减弱,见图 3C。

2.4 DDX5 对 K562 细胞凋亡的影响 采用 Annexin V-FITC 结合 PI 双染法分析敲低 DDX5 基因后对 K562 细胞凋亡的影响,结果如图 4 所示,与 si-NC 组相比,si-DDX5 组 K562 细胞的凋亡率增加,差异有统计学意义 ($F = 41.019$, $P < 0.01$)。

2.5 DDX5 对 K562 细胞分化的影响 采用流式细胞术分析沉默 DDX5 后对 K562 细胞分化的影响,

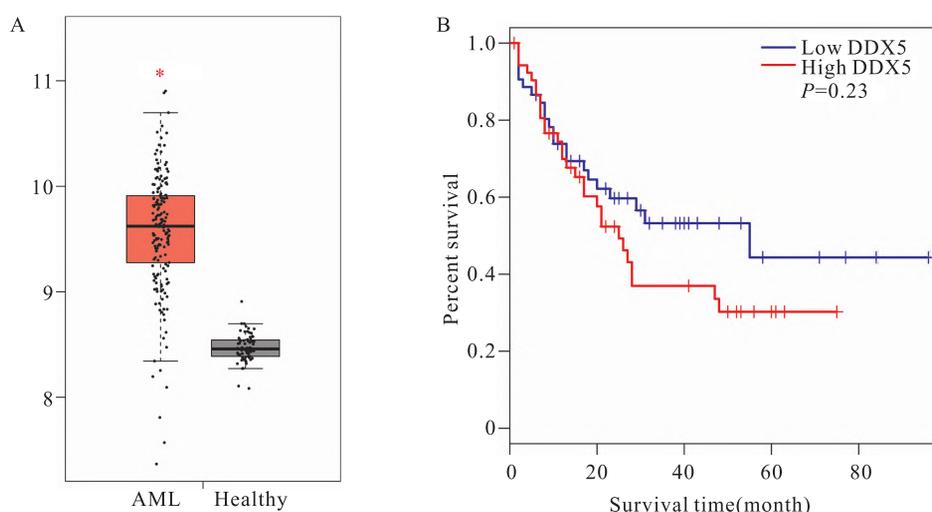


图 1 DDX5 在 AML 患者中的表达情况及临床相关性分析

Fig.1 Expression of DDX5 in AML patients and its clinical relevance analysis

A: The expression levels of DDX5 mRNA in bone marrow tissues of AML patients and healthy individuals; B: Survival analysis based on the expression levels of DDX5 mRNA; * $P < 0.05$ vs healthy individuals.

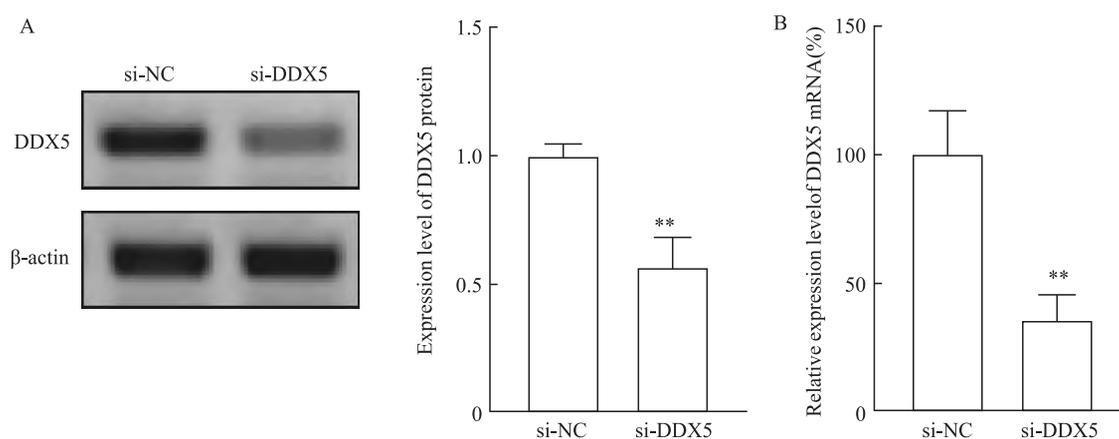


图 2 K562 细胞中 DDX5 敲低效果的鉴定

Fig.2 Verification of DDX5 knockdown effect in K562 cells

A: Western blot analysis of DDX5 protein expression levels in K562 cells; B: qRT-PCR analysis of DDX5 mRNA expression levels in K562 cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

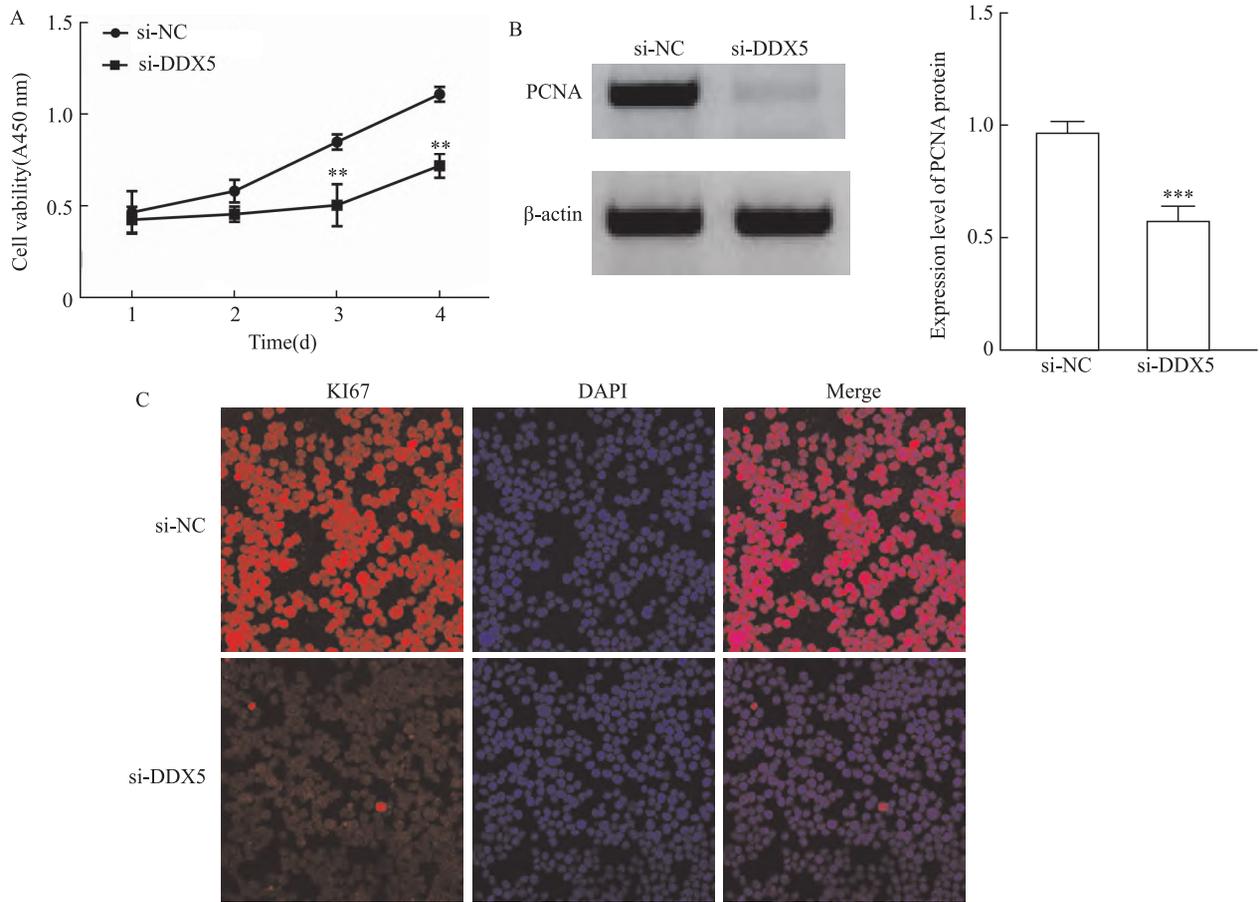


图3 DDX5对K562细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of DDX5 on proliferation of K562 cell proliferation

A: The impact of DDX5 silencing on the viability of K562 cells; B: Western blot analysis of PCNA protein expression levels in K562 cells; C: Immunofluorescence staining of KI67 protein in K562 cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

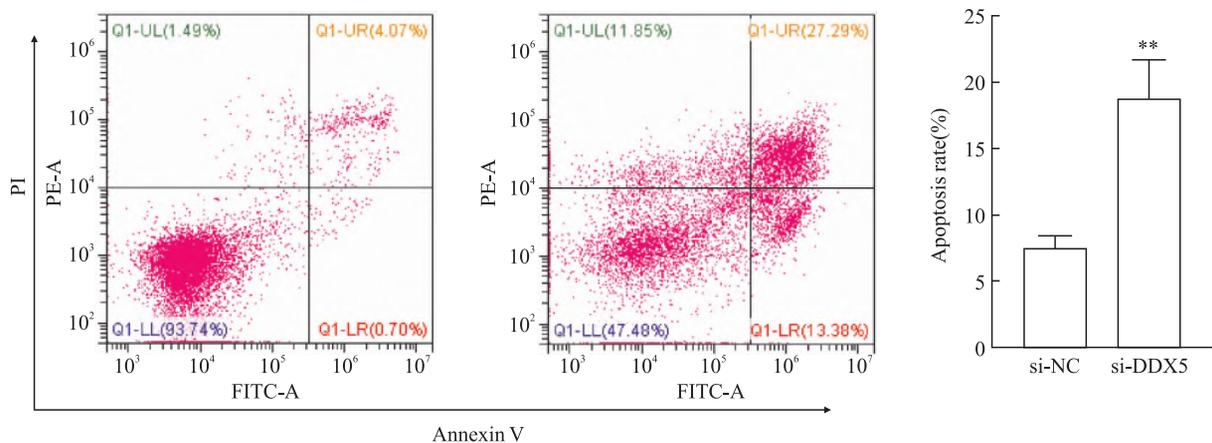


图4 沉默DDX5对K562细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of DDX5 silencing on apoptosis in K562 cell apoptosis

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

结果如图5A、5B所示,与si-NC组相比,si-DDX5组K562细胞的CD11b ($F = 27.001$, $P < 0.01$)和CD14 ($F = 38.904$, $P < 0.01$)阳性细胞率增加,差异有统

计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot结果(图5C、5D)同样显示,与si-NC组相比,si-DDX5组细胞中CD11b ($F = 16.905$, $P < 0.05$)和CD14 ($F =$

22.493, $P < 0.01$) 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 DDX5 影响白血病细胞的 P53 信号通路 通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验, 在 K562 细胞系中验证 DDX5 对 P53 信号通路相关基因表达的影响。结果显示, 在 K562 细胞中敲低 DDX5 基因后, P53 ($F = 81.293$, $P < 0.01$) 和 P21 ($F = 51.022$, $P < 0.05$) 的蛋白表达水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); P53 ($F = 46.378$, $P < 0.01$) 和 P21

($F = 18.192$, $P < 0.01$) 的 mRNA 表达水平均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6。

3 讨论

儿童白血病作为 15 岁以下儿童肿瘤的重要类型, 其发病率高达约三成^[9], 并伴随着显著的病死率挑战, 凸显了疾病治疗的紧迫性。当前, 虽然骨髓移植与化疗是主要的治疗手段, 但化疗伴随的强烈副作用及高复发率, 加之骨髓配型的困难, 均构成了

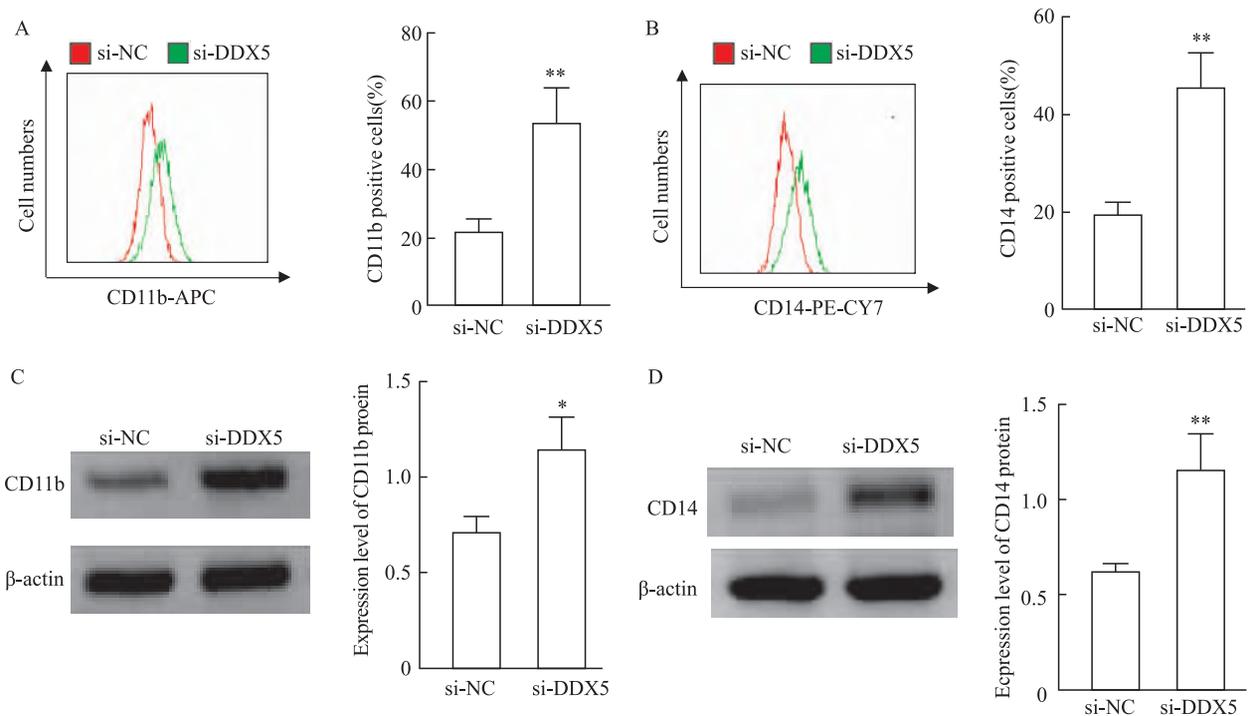


图 5 DDX5 对 K562 细胞分化的影响

Fig. 5 The effect of DDX5 on K562 cell differentiation

A, B: The impact of DDX5 silencing on K562 cell differentiation; C, D: Western blot analysis of CD11b and CD14 protein expression levels in K562 cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

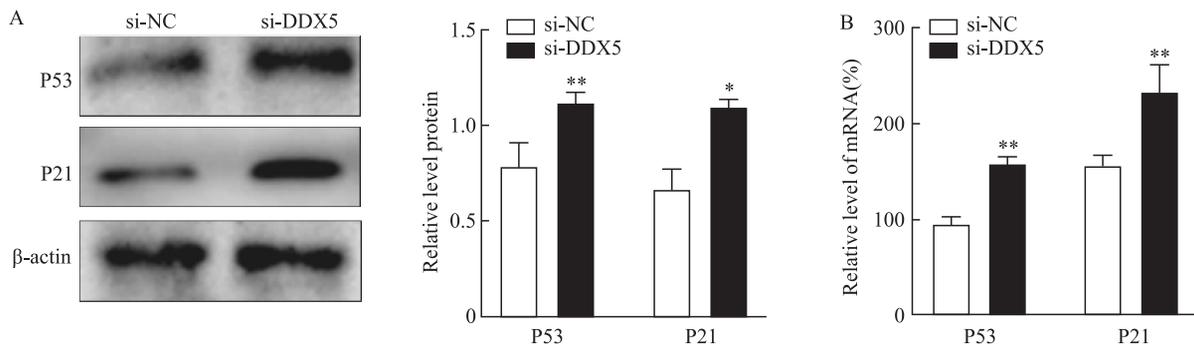


图 6 DDX5 对 P53 信号通路的影响

Fig. 6 The effect of DDX5 on P53 signaling pathway

A: Western blot analysis of P53 and P21 protein expression levels in K562 cells; B: qRT-PCR analysis of P53 and P21 mRNA expression levels in K562 cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

治疗上的重重障碍。近年来,分子生物学的飞跃为揭示疾病本质开辟了新径,尤其是基因异常表达机制的阐明,为优化治疗策略提供了科学依据^[10]。在此背景下,深入探索并确认与白血病紧密相关的基因靶点,不仅对于精准医疗、靶向药物开发具有重要意义,还能够有效指导治疗决策,提升预后评估的准确性,从而为白血病患者带来更为个性化的治疗选择与更好的生存希望。

DDX5 是首个被证实以 ATP 依赖机制执行 RNA 解旋功能的蛋白质,广泛分布于细菌、真菌及人类等生物体内,但主要集中在哺乳动物的细胞核中^[11]。研究^[12]表明,DDX5 在结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤中的表达呈现异常。特别是在结肠癌中,DDX5 表达水平的上升会推动蛋白激酶 B (AKT) 及其 mRNA 的增多,进而促进 DDX5、 β -catenin 及核因子- κ B 与 AKT 启动子的结合,这一过程能激活 c-Myc、cyclin D1、c-jun 等致癌基因的转录,加速结肠癌细胞的增殖^[13]。相反,当 DDX5 基因被敲除时,肿瘤细胞的增殖受到明显抑制。随着 DDX5 表达水平的增加,它在促进肠息肉向更恶性阶段转变中扮演重要角色,故 DDX5 的表达程度被视作评估结肠癌临床分期的一个潜在指标^[14]。在乳腺癌中,DDX5 通过引导 RNA 聚合酶 II 至 E2F 基因的启动区域,加速细胞从 G1 期进入 S 期,从而直接调控 DNA 复制相关因子的表达^[12],这一机制促进了肿瘤细胞的增殖^[15]。此外,在白血病、前列腺癌、胶质瘤及非小细胞肺癌等多种癌症中,DDX5 的表达同样呈上升趋势^[16]。本项研究特别指出,DDX5 在白血病患者体内表现出异常高水平的表达,且 DDX5 表达较低的患者往往拥有更长的生存期,这提示 DDX5 或可成为白血病治疗领域的一个新兴治疗靶点。

白血病的主要成因涉及造血干细胞的异常增殖及分化障碍。本研究通过体外细胞实验揭示了 DDX5 与白血病细胞 K562 的增殖、凋亡及分化过程紧密相关。实验发现,抑制 DDX5 的表达能显著削弱白血病细胞的增殖能力,促进其凋亡并诱导其分化。这些发现暗示 DDX5 在白血病中可能扮演了类似促癌基因的角色。DDX5 作为关键的转录因子,对生长调节及肿瘤进展至关重要^[17]。除肝细胞癌外,DDX5 在高达 92.8% 的人类肿瘤中均有表达。在肿瘤细胞系和动物模型中,DDX5 的敲除能触发肿瘤细胞凋亡,从而抑制其增殖。

综上所述,本研究结果表明 DDX5 可能具有促

进白血病细胞恶性转化的作用。初步探讨了 DDX5 在白血病细胞中的功能和作用机制,为未来研发白血病新的诊治措施提供了理论依据。下一步将继续收集白血病患者临床相关数据进行分析,并在公共数据库数据中验证,进一步研究 DDX5 在白血病细胞中的可能调节机制。

参考文献

- [1] Juliusson G, Hough R. Leukemia [J]. *Prog Tumor Res*, 2016, 43: 87 - 100. doi: 10.1159/000447076.
- [2] Zhang D G, Zhang J L, Mao L L, et al. p21-activated kinase 5 affects cisplatin-induced apoptosis and proliferation in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36 (5): 3685 - 91. doi: 10.1007/s13277-014-3007-5.
- [3] González-Duarte R J, Cázares-Ordofiez V, Díaz L, et al. The expression of RNA helicase DDX5 is transcriptionally upregulated by calcitriol through a vitamin D response element in the proximal promoter in SiHa cervical cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 410 (1-2): 65 - 73. doi: 10.1007/s11010-015-2538-4.
- [4] Nicol S M, Bray S E, Black H D, et al. The RNA helicase p68 (DDX5) is selectively required for the induction of p53-dependent p21 expression and cell-cycle arrest after DNA damage [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (29): 3461 - 9. doi: 10.1038/onc.2012.426.
- [5] Alisoltani A, Fallahi H, Ebrahimi M, et al. Prediction of potential cancer-risk regions based on transcriptome data: towards a comprehensive view [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (5): e96320. doi: 10.1371/journal.pone.0096320.
- [6] Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: focus on basal-like carcinomas [J]. *Cancers*, 2017, 9 (10): 134. doi: 10.3390/cancers9100134.
- [7] Xue Y, Jia X B, Li L, et al. DDX5 promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via Akt signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503 (4): 2885 - 91. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.063.
- [8] Fu Q F, Song X, Liu Z, et al. miRomics and proteomics Reveal a miR-296-3p/PRKCA/FAK/Ras/c-Myc feedback loop modulated by HDGF/DDX5/ β -catenin complex in lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (20): 6336 - 50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2813.
- [9] Namayandeh S M, Khazaei Z, Lari Najafi M, et al. GLOBAL leukemia in children 0 - 14 statistics 2018, incidence and mortality and human development index (HDI); GLOBOCAN sources and methods [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21 (5): 1487 - 94. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.5.1487.
- [10] Bispo J A B, Pinheiro P S, Kobetz E K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10 (6): a034819. doi: 10.1101/cshperspect.a034819.
- [11] Fan Y, Chen Y K, Zhang J, et al. Protective role of RNA helicase DEAD-box protein 5 in smooth muscle cell proliferation and vascular remodeling [J]. *Circ Res*, 2019, 124 (10): e84 - 100. doi:

- 10.1161/CIRCRESAHA.119.314062.
- [12] Hashemi V, Masjedi A, Hazhir-Karzar B, et al. The role of DEAD-box RNA helicase p68 (DDX5) in the development and treatment of breast cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5):5478–87. doi:10.1002/jcp.26912.
- [13] Aghabozorgi A S, Ebrahimi R, Bahiraei A, et al. The genetic factors associated with Wnt signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Life Sci*, 2020, 256:118006. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118006.
- [14] Wu N, Jiang M Z, Han Y Y, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer progression by regulating protein stability and potential catinogenic function of DDX5 [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2):1354–62. doi: 10.1111/jemm.14038.
- [15] Alqahtani H, Gopal K, Gupta N, et al. DDX17 (P72), a Sox2 binding partner, promotes stem-like features conferred by Sox2 in a small cell population in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(2):42–50. doi:10.1016/j.cellsig.2015.11.004.
- [16] Wu J, You Y Q, Ma Y X, et al. DDX5-targeting fully human monoclonal autoantibody inhibits proliferation and promotes differentiation of acute promyelocytic leukemia cells by increasing ROS production [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):552. doi:10.1038/s41419-020-02759-5.
- [17] Nyamao R M, Wu J, Yu L, et al. Roles of DDX5 in the tumorigenesis, proliferation, differentiation, metastasis and pathway regulation of human malignancies [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(1):85–98. doi:10.1016/j.bbcan.2018.11.003.

Effect of DDX5 on the biological function of leukemia K562 cells and its mechanism

Hu Shuang¹, Chen Xiaoran², Feng Yubin³

[¹*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013*; ³*Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Anhui Provincial Key Laboratory of Precision Pharmaceutical Preparations and Clinical Pharmacy, Hefei 230001*]

Abstract Objective To investigate the effect of DEAD-box RNA helicases (DDX5 helicase) on the proliferation, apoptosis and differentiation of leukemia cell line K562 cells. **Methods** Data from the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) cancer gene database was utilized to analyze the expression of DDX5 mRNA in tissues of leukemia patients. Survival curve analysis was conducted to assess the relationship between DDX5 mRNA expression levels and the prognosis of leukemia patients. Small interfering RNA (siRNA) was used for transient transfection of K562 cells to knock down DDX5. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was employed to verify the silencing effect, and Western blot was used to detect protein expression levels. CCK-8 assay was conducted to examine cell proliferation capability, and Western blot and immunofluorescence were utilized to detect the expression levels of cell proliferation-related proteins. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and the expression levels of cell differentiation-related proteins were assessed by flow cytometry and Western blot. Lastly, the effects of DDX5 silencing on the expression levels of P21 and P53 proteins were examined by RT-PCR and Western blot. **Results** GEPIA database analysis revealed that the expression level of DDX5 in human leukemia bone marrow tissues was significantly higher than that in healthy individuals, and patients with low DDX5 expression had longer survival time. *In vitro* experiments demonstrated that knocking down DDX5 significantly inhibited the proliferation of K562 cells. Flow cytometry results indicated that DDX5 silencing promoted apoptosis and induced cell differentiation by enhancing the expression of CD11b and CD14 proteins. Furthermore, silencing DDX5 up-regulated the expression levels of P21 and P53 proteins. **Conclusion** DDX5 may potentially inhibit the proliferation of leukemia cell line K562, promote apoptosis, and induce differentiation by targeting P53.

Key words K562 cells; DDX5; cell proliferation; apoptosis; cell differentiation; P53

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82300177); Key Research and Development Project of Anhui Province (No. 2022e07020010)

Corresponding author Feng Yubin, E-mail: fengyubin@ustc.edu.cn