

文章编号: 1001-6325(2024)07-0959-06

研究论文

## DDX60 促进系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 I 型干扰素的表达

袁 勋, 王宇扬, 孟 姝\*

中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 免疫学系, 北京 100005

**摘要:**目的 探究 DExD/H 盒解旋酶 60(DDX60)通过调控 dsDNA-cGAS-IFN- I 通路对系统性红斑狼疮(SLE)进展的作用机制。方法 通过分析 RNA 测序数据集发现 DDX60 mRNA 水平在 SLE 患者和健康人外周血单个核细胞(PBMCs)中的差异。分析 SLE 患者 PBMCs 的 DDX60 mRNA 水平与疾病活动度的相关关系。通过  $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ )刺激人源单核细胞系 THP-1,明确 DDX60 是否为干扰素诱导基因(ISG)。通过沉默和敲除 DDX60,再转染双链 DNA(dsDNA)poly(dA:dT),利用 RT-qPCR 检测  $\beta$ 1 干扰素(IFNB1)的 mRNA 水平。结果 RNA 测序数据集和 RT-qPCR 结果表明 DDX60 在 SLE 患者 PBMCs 中高表达。相关性分析表明,SLE 患者 PBMCs 的 DDX60 mRNA 水平与疾病活动度呈正相关关系。IFN- $\alpha$  可以诱导 THP-1 细胞表达 DDX60,表明 DDX60 是 ISG。沉默 DDX60 后,poly(dA:dT)诱导的 IFNB1 mRNA 水平显著降低。结论 DDX60 在 SLE 患者 PBMCs 中高表达,IFN- I-DDX60-dsDNA-cGAS-IFN- I 正反馈通路参与 SLE 进展,可能成为 SLE 临床诊治的靶点,具有诊断及预后评估价值。

**关键词:** DExD/H 盒解旋酶 60(DDX60);环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS); I 型干扰素;系统性红斑狼疮  
中图分类号:R392.3 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2024.07.0959

## DDX60 promotes expression of type I interferon in PBMCs from patients with systemic lupus erythematosus

YUAN Xun, WANG Yuyang, MENG Shu\*

Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China

**Abstract: Objective** To explore the role of DExD/H box helicase 60(DDX60) in the development of systemic lupus erythematosus (SLE) by regulating the dsDNA-cGAS-IFN- I pathway. **Methods** Differences in DDX60 mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from SLE patients and healthy people were examined by analyzing RNA sequencing data and verified by RT-qPCR. The correlation between DDX60 mRNA level in PBMCs and disease activity of SLE patients was analyzed. Whether DDX60 was an interferon-stimulated gene (ISG) was clarified by interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) stimulation of human acute monocyte leukemia cell line THP-1. The mRNA level of interferon-beta1 (IFNB1) was detected by RT-qPCR after silencing and knockdown of DDX60 and followed by double-stranded DNA (dsDNA) poly(dA:dT) transfection. **Results** RNA sequencing data and RT-qPCR result found high expression of DDX60 in PBMCs of SLE patients. DDX60 mRNA level in PBMCs was positively correlated with disease activity of SLE patients. IFN- $\alpha$  induced THP-1 cells to express DDX60, suggesting

收稿日期:2024-02-18 修回日期:2024-05-21

基金项目:国家自然科学基金(82171726)

\* 通信作者 (corresponding author): mengshu129@163.com

that *DDX60* was an ISG. Silencing *DDX60* resulted in a decrease in poly (dA:dT)-induced IFN $\beta$ 1 mRNA level.

**Conclusions** *DDX60* is highly expressed in PBMCs of SLE patients and involved in the development of SLE through the positive feedback loop of IFN- $\beta$ 1-*DDX60*-dsDNA-cGAS-IFN- $\beta$ 1, which suggests that *DDX60* may be a target for the clinical diagnosis and treatment of SLE. The result of this research may support diagnosis and prognosis evaluation of SLE patients.

**Key words:** DExD/H box helicase 60 (*DDX60*); cyclic GMP-AMP synthase (cGAS); type I interferon; systemic lupus erythematosus

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种典型的系统性自身免疫病, 患者血清中出现以抗核抗体为代表的多种自身抗体, 全身多脏器结缔组织受累, 可引起肺部病变, 严重损害患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。血清中 I 型干扰素 (type I interferon, IFN- $\beta$ 1) 水平升高是 SLE 的主要病理特征之一, 其水平与患者疾病活动度呈正相关<sup>[3]</sup>。IFN- $\beta$ 1 (包括  $\alpha$  干扰素和  $\beta$  干扰素) 作为一种重要的免疫调节因子, 可以经 JAK-STAT 通路诱导下游大量干扰素刺激基因 (interferon-stimulated gene, ISG) 表达, 包括环鸟苷酸-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) 和 DExD/H 盒解旋酶 58 (DExD/H box helicase 58, *DDX58*) 等模式识别受体以及干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 1/7 等通路分子<sup>[4]</sup>。SLE 患者血清高水平的 IFN- $\beta$ 1 可作为危险信号, 促进组织浸润免疫细胞的免疫反应及 IFN- $\beta$ 1 产生, 形成时空闭环, 导致疾病进展。虽然患者外周血循环免疫细胞表现出典型的“ I 型干扰素特征” (IFN- $\beta$ 1 signature), 但几乎不表达 IFN- $\beta$ 1, 推测 IFN- $\beta$ 1 可能来源于外周组织浸润的免疫细胞<sup>[5]</sup>。

SLE 患者外周组织发现大量免疫细胞, 特别是中性粒细胞的浸润、活化与死亡, 细胞死亡释放的双链 DNA (dsDNA) 被免疫细胞胞质中的 cGAS 识别, 介导 IFN- $\beta$ 1 产生, 促进 SLE 进展<sup>[6]</sup>。作为一种胞质 dsDNA 受体 cGAS, 在天然免疫细胞识别“自我”与“非我”的过程中发挥重要作用, 其介导的 cGAS-STING 通路近年来受到广泛关注。已有大量研究表明 cGAS-STING 通路在 SLE 中具有关键致病作用, 研究该通路的调控分子机制对于理解 SLE 的发病机制以及临床干预策略具有重要意义。

DExD/H 盒解旋酶 (DExD/H-box RNA helicases) 是一个庞大的蛋白质家族, 解旋酶结构域是该家族的核心结构域, 其包含一段保守的 DEAD (Asp-Glu-

Ala-Asp) 基序, 是 DExD/H 盒解旋酶发挥功能的关键基序<sup>[7]</sup>。除了作为 RNA 解旋酶发挥 RNA 加工以及基因表达与调控等经典功能外, 非经典功能如调控免疫应答, 也受到了广泛关注, 如经典的双链 RNA (dsRNA) 受体 *DDX58* 以及各种通路调控分子如 *DDX41*<sup>[7-10]</sup>。*DDX60* 作为该家族的一员在 SLE 患者中显著高表达, 但其分子机制及在 SLE 发病中的意义并不十分清楚。本研究通过生物信息学分析以及利用 THP-1 细胞进行细胞水平实验, 证实 IFN- $\beta$ 1 可以诱导 *DDX60* 表达, 高表达的 *DDX60* 促进 dsDNA-cGAS-IFN- $\beta$ 1 通路, 由此形成通路正反馈, 且 *DDX60* 表达水平与 SLE 患者疾病活动度 (SLE disease activity index, SLEDAI) 呈正相关。该研究拓展了对 SLE 发病的分子机制认识, 对临床的治疗方案可能具有指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

IFN- $\alpha$  及佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA) (MedChemExpress 公司); SiRNA (Ribobio 公司); Si-NC、si-*DDX60*; Poly (dA:dT) (Invivogen 公司); 转染试剂 RNAiMAX 及 BCA 蛋白质检测试剂盒 (Thermo Fisher 公司); 转染试剂 JetPrime (Polyplus 公司); 总 RNA 抽提试剂盒 (Fastagen 公司); 反转录试剂盒及 SYBR green qPCR 试剂盒 (Toyobo 公司); 抗 GAPDH 抗体、抗 *DDX60* 抗体 (Sigma-Aldrich 公司); 细胞系: 人单核巨噬细胞系 THP-1 (国家实验细胞资源共享平台)。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 测序数据分析: 从 GEO 数据库下载 RNA 测序数据集 GSE222408、GSE218492、GSE148810 和 GSE148601, 使用 RStudio 软件以及 limma 和 edgeR 等包进行差异基因分析, ggplot2、pheatmap、

corplot 包进行绘制相关图形。

1.2.2 细胞培养与处理:用含 10%胎牛血清的 1640 培养基培养 THP-1 细胞。以终浓度 1 000 U/mL 的 IFN- $\alpha$  刺激细胞,6 h 后收集细胞进行 RT-qPCR 检测。

1.2.3 SiRNA 转染:将 THP-1 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔培养板中,每孔加入 10 ng PMA 诱导 THP-1 分化成巨噬细胞,24 h 后更换新鲜 1640 培养基,每孔 400  $\mu$ L。将 siRNA(终浓度 50 pmol/L)、转染试剂 RNAiMAX (3  $\mu$ L)、Opti-MEM 培养基 (100  $\mu$ L)混匀,静置 5 min 后,逐滴加入到细胞中,36 h 后进行后续实验。利用 Western blot 检测干扰效率。

1.2.4 Poly(dA:dT)转染:SiRNA 转染 THP-1 细胞 36 h 后更换新鲜 1640 培养基,每孔 400  $\mu$ L。将 poly (dA:dT) (2  $\mu$ g/mL)、转染试剂 JetPrime (2  $\mu$ L)、Opti-MEM 培养基 (100  $\mu$ L)混匀,静置 15 min 后,逐滴加入到细胞中。6 h 后收集细胞进行 RT-qPCR 检测。

1.2.5 RT-qPCR 检测 mRNA 水平:用 RNA 提取试剂盒提取 THP-1 细胞总 RNA。反转录成 cDNA 后,采用 SYBRgreen 染料法进行 RT-qPCR (95  $^{\circ}$ C 变性 60 s,56  $^{\circ}$ C 退火 15 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环),检测典型 I 型干扰素,以  $\beta$ 1 干扰素 (interferon-beta1, *IFNB1*) 为代表的 mRNA 水平,以 *GAPDH* 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。*GAPDH* 引物序列:F:

5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', R: 5'-GGCTG TTGTCATACTTCTCATGG-3'; *DDX60* 引物序列:F: 5'-CAGCTCCAATGAAATGGTGCC-3', R: 5'-CTCAGG GGTTTATGAGAATGCC-3'; *IFNB1* 引物序列:F: 5'-ATGACCAACAAGTGTCTCTCTCC-3', R: 5'-GGAATCC AAGCAAGTTGTAGCTC-3'。

1.2.6 Western blot 检测蛋白质表达:裂解细胞,BCA 法测定蛋白质浓度。蛋白质经变性,SDS-PAGE,转膜,封闭,一抗(抗 GAPDH 抗体、抗 DDX60 抗体)和二抗孵育,ECL 法显影。

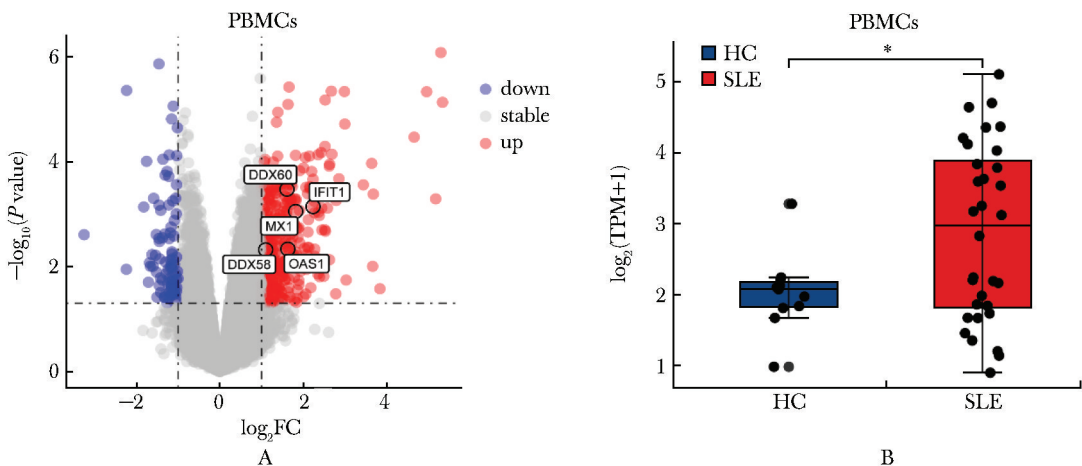
### 1.3 统计学分析

所有实验均经过 3 次以上重复,采用 R 4.2.3 软件进行统计学分析,计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  或均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间差异比较采用 Wilcoxon 检验或  $t$  检验,相关分析采用 Pearson 相关,  $P < 0.05$  被认为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 SLE 患者 PBMCs 高表达 DDX60

从 GEO 数据库下载 RNA 测序数据集 (GSE222408),对 32 例 SLE 患者和 11 名健康人 PBMCs 的测序结果进行差异分析,筛选出  $P < 0.05$ 、差异倍数 (fold change, FC)  $> 2$  或  $< 0.5$  的差异基因,包括 334 个上调基因,92 个下调基因,其中 DDX60 在 SLE 患者 PBMCs 中显著高表达 ( $P < 0.01$ ) (图 1A, B)。



A. volcano plot of differential mRNA in PBMCs from 32 SLE patients and 11 healthy people from GSE222408; B. boxplot of DDX60 mRNA level in PBMCs from SLE patients and healthy controls (HC); \* $P < 0.01$  compared with HC.

图 1 SLE 患者比健康人 PBMCs 中 DDX60 的 mRNA 水平升高

Fig 1 DDX60 mRNA level in PBMCs of SLE patients was higher than that of healthy people

## 2.2 DDX60 mRNA 水平与 SLE 疾病活动度正相关

DDX60 在 SLE 患者中高表达,推测 DDX60 表达水平可能具有预后意义。从 GEO 数据库下载数据集(GSE148601),分析 22 例 SLE 患者和 14 名健康人的 RNA 测序数据和临床数据,发现 SLE 患者 PBMCs 的 DDX60 mRNA 水平与疾病活动度(SLE-DAI)具有显著正相关关系( $P < 0.01$ ) (图 2A),且在治疗后有下降趋势,但差异无统计学意义(图 2B)。

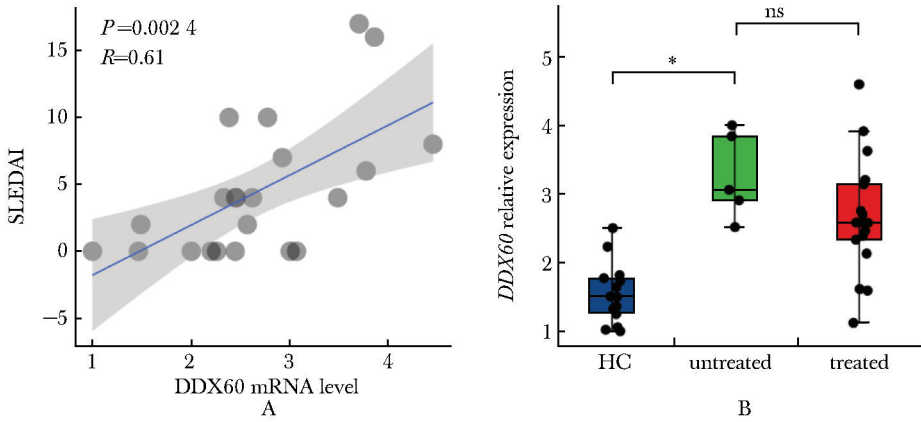
## 2.3 DDX60 表达水平与 IFN- I 正相关

已有研究证实 *DDX60* 是一个 ISG<sup>[5]</sup>。通过

分析 RNA 测序数据集(GSE218492)发现 IFN- $\alpha$  可以显著增加人单核细胞表达 DDX60(图 3A) ( $P < 0.01$ )。通过分析 SLE 患者损伤皮肤样本的 RNA 测序数据(GSE148810),发现 DDX60 与 IFN- I 以及 ISGs mRNA 水平正相关(图 3B)。

## 2.4 IFN-I 诱导表达的 DDX60 促进 dsDNA-IFN-I 通路

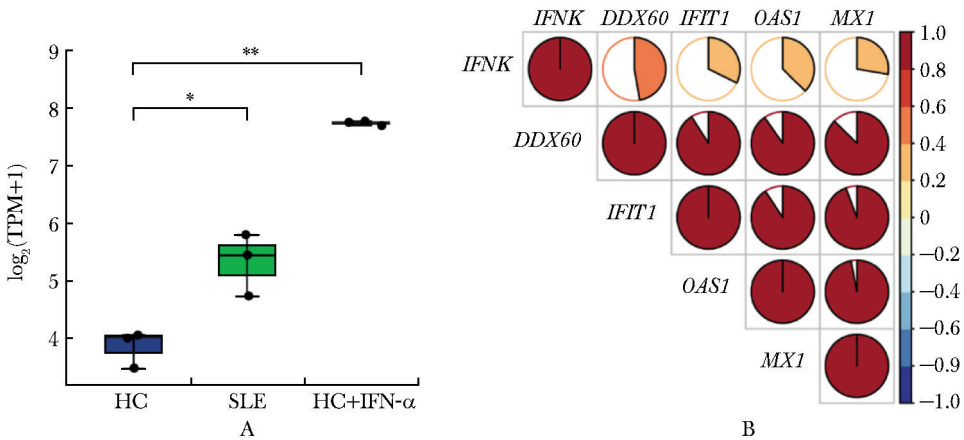
检测发现,DDX60 在 SLE 患者 PBMCs 中的表达显著高于健康人( $P < 0.01$ ) (图 4A)。用 IFN- $\alpha$  刺激 THP-1 细胞,证实 IFN- $\alpha$  可以显著诱导 DDX60 表达( $P < 0.001$ ) (图 4B)。dsDNA-cGAS-IFN-I 通



A. correlation between DDX60 mRNA level in PBMCs and SLEDAI of SLE patients;  $n = 36$ ; B. DDX60 mRNA level in PBMCs from healthy controls (HC) and SLE patients with or without treatment;  $n = 36$ ; \* $P < 0.01$  compared with HC.

图 2 DDX60 mRNA 水平与 SLE 患者疾病活动度正相关

Fig 2 DDX60 mRNA level was positively correlated with disease activity of SLE patients



A. boxplot of DDX60 mRNA level in monocytes from SLE patients and healthy people (HC) induced by IFN- $\alpha$ ;  $n = 9$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with HC; B. pieplot of correlation between mRNA level of DDX60, IFN- I and ISGs from SLE skin sample with lesion;  $n = 15$ ; IFNK. interferon kappa; IFIT1. interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1; OAS1. 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1; MX1. MX dynamin like GTPase 1.

图 3 DDX60 表达水平与 IFN- I 正相关

Fig 3 DDX60 expression level was positively correlated with IFN- I



路参与 SLE 进展<sup>[6]</sup>, DExD/H 盒解旋酶家族成员广泛参与该通路的调控<sup>[7-10]</sup>, 已有研究表明 DDX60 促进 HSV-1 诱导的 IFN- I 产生<sup>[11]</sup>, 推测 DDX60 可能也参与了 dsDNA-cGAS-IFN- I 通路的调控。在 THP-1 细胞中沉默 DDX60, 转染 poly(dA:dT), 通过 RT-qPCR 检测 IFNB1 mRNA 水平。沉默 DDX60 显著降低 poly(dA:dT) 诱导细胞产生的 IFNB1 mRNA 水平( $P < 0.01$ ) (图 4C, D)。

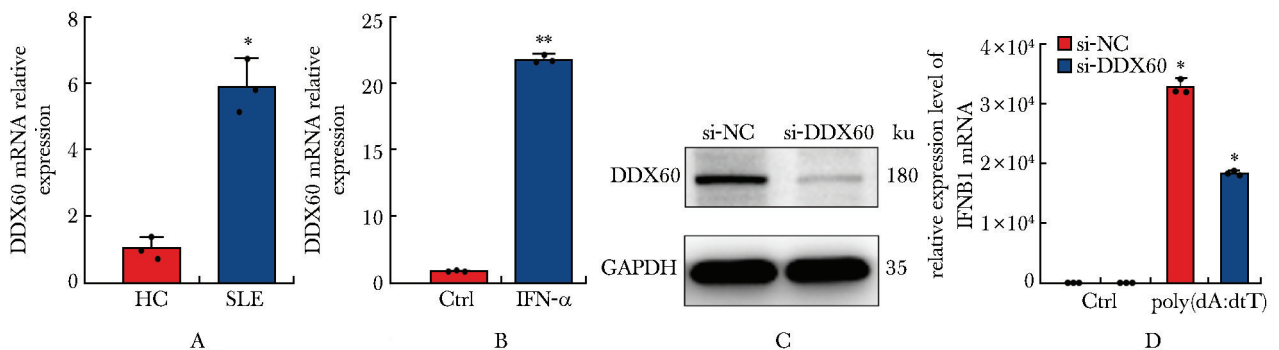
### 3 讨论

SLE 患者血清高水平的 IFN- I 可以致敏外周血循环免疫细胞, 显著增强组织浸润免疫细胞的效应以及 IFN- I 产生, 由此形成正反馈, 导致病情持续进展<sup>[1-5]</sup>。鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)作为 ISG 和 dsDNA 受体, 其介导的 dsDNA-cGAS-IFN- I 通路是 SLE 病理过程的重要一环<sup>[6]</sup>。那么哪些分子参与该通路的调控, 靶向该分子是否能够成为临床延缓 SLE 患者病情的治疗新策略, 是目前该领域的研究热点。

DExD/H 盒解旋酶(DExD/H box helicase) 家族的经典功能是作为 RNA 解旋酶加工 RNA, 参与重要基因的表达调控, 但其非经典功能例如调控免疫应答, 也受到了广泛关注<sup>[7]</sup>。DDX41 作为 dsDNA 受体介导 dsDNA-DDX41-IFN- I 通路的传递<sup>[8]</sup>; DDX3X 与 TBK1 相互作用, 促进细菌 DNA 诱导细

胞产生 IFN- I<sup>[9]</sup>; DDX3 与 IKK $\epsilon$  相互作用, 促进细胞抗病毒免疫应答<sup>[10]</sup>; DDX60 在病毒感染的细胞中高表达, 促进 RIG-I 与 dsRNA 的结合以及 IFN- I 产生<sup>[5, 11]</sup>。DDX60 作为 ISG 基因在 SLE 患者细胞中高表达, 其生物学意义目前仍不清楚。本研究发现, DDX60 受 IFN- I 诱导表达, 促进 dsDNA-cGAS-STING-IFN- I 通路的传递, 进而促进 SLE 的疾病进展, 可作为 SLE 临床治疗的潜在靶点。同时 DDX60 表达水平与 SLE 疾病活动度显著正相关, 且在治疗后有下降趋势, 具有一定的临床诊断及预后价值。本研究拓展了对 cGAS-STING 通路调控、DExD/H 盒解旋酶家族成员的功能以及 SLE 病理机制的认识。DExD/H 盒解旋酶家族其他成员是否也参与了 SLE 的进展值得进一步研究。

Poly(dA:dT) 作为 dsDNA, 常被用于 dsDNA-cGAS-IFN- I 通路的研究。但也有研究表明, poly(dA:dT) 可被 RNA 聚合酶 III 转录成 dsRNA, 进而诱导 RIG-I/MDA5-IFN- I 通路的传递<sup>[12-13]</sup>; 此外, TLR7 过表达小鼠可以自发 SLE, 且 TLR7 功能获得性突变可以导致 SLE 发生<sup>[14-15]</sup>; SLE 患者抗 RNP 抗体与血清 IFN- I 水平呈正相关<sup>[3]</sup>; 近期也有研究表明 mtRNA 泄露可能促进了 SLE 的进展<sup>[16]</sup>。综上所述, 除 dsDNA 外, dsRNA 介导的免疫反应也可能参与了 SLE 的病理过程, 提示 DDX60 可能同时参与调控两条通路。有研究表明, DDX60 具有结合 dsDNA



A. boxplot of DDX60 mRNA level in PBMCs from SLE patients and healthy controls (HC); \* $P < 0.01$  compared with HC; B. barplot of DDX60 mRNA level in THP-1 cells induced by IFN- $\alpha$ ; \*\* $P < 0.001$  compared with control (Ctrl); C. DDX60 protein level in THP-1 cells transfected with negative control (si-NC) or si-DDX60; D. IFNB1 mRNA level in THP-1 cells transfected with si-NC or si-DDX60 followed by poly(dA:dT) stimulation; \* $P < 0.01$  compared with si-NC.

图 4 IFN- I 诱导的 DDX60 促进 dsDNA-IFN- I 通路

Fig 4 IFN- I -induced DDX60 promoted the dsDNA-IFN- I pathway ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

的能力<sup>[11]</sup>,可能作为 dsDNA 受体介导 dsDNA-DDX60-IFN- I 通路或通过相分离参与 dsDNA-cGAS-STING-IFN- I 通路的调控<sup>[8-10]</sup>,本研究未来将

对可能的机制进行验证,并拟利用 *DDX60* 敲除的 SLE 模型小鼠进一步证明 *DDX60* 对 SLE 疾病进展的重要调控作用以及临床转化的可行性。

## 参考文献:

- [1] 曹雪涛,何维.医学免疫学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2015:319-320.
- [2] 孔杰,高瑛瑛,王雪琴,等.基于 miRNA 芯片对系统性红斑狼疮的生物信息学分析[J].基础医学与临床,2021,41:865-870.
- [3] Rozenberg F, Crow YJ, Duffy D, *et al.* Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease [J]. *J Exp Med*, 2017, 214: 1547-1555.
- [4] Jones CT, Bieniasz P, Rice CM, *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. *Nature*, 2011, 472: 481-485.
- [5] Criswell LA, Zaitlen N, Ye CJ, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus[J]. *Science*, 2022, 376: 65-89.
- [6] Li QZ, Wight-Carter M, Chen ZJ, *et al.* Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 699-705.
- [7] Chaperot L, Qin J, Liu YJ, *et al.* Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 15181-15186.
- [8] Lu N, Kim T, Liu YJ, *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12: 959-965.
- [9] Bennett KL, Decker T, Superti-Furga G, *et al.* The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response[J]. *EMBO J*, 2008, 27: 2135-2146.
- [10] Schröder M, Baran M, Bowie AG. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKK epsilon-mediated IRF activation [J]. *EMBO J*, 2008, 27: 2147-2157.
- [11] Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, *et al.* DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG- I -like receptor-mediated signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 3802-3819.
- [12] Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG- I pathway [J]. *Cell*, 2009, 138: 576-591.
- [13] Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V, *et al.* RIG- I -dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10: 1065-1072.
- [14] Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S, *et al.* Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication[J]. *Science*, 2006, 312: 1669-1672.
- [15] Gantier MP, Athanasopoulos V, Vinuesa CG, *et al.* TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus[J]. *Nature*, 2022, 605: 349-356.
- [16] Jefferies C, Frezza C, O'Neill LAJ, *et al.* Macrophage fumarate hydratase restrains mtRNA-mediated interferon production[J]. *Nature*, 2023, 615: 490-498.