

# 沉默 DDX17 通过降低 mTORC1 活性抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移

邓湘湘<sup>1,2</sup>, 王嘉<sup>2,3</sup>, 熊迷<sup>1,2</sup>, 王挺<sup>2</sup>, 杨永健<sup>2</sup>, 李德<sup>2</sup>, 孙雄山<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>西南医科大学临床医学院心血管内科, 四川 泸州 646000; <sup>2</sup>西部战区总医院心血管内科, 四川 成都 610083; <sup>3</sup>西南交通大学医学院, 四川 成都 610031

**摘要:**目的 探讨 DDX17 在肺动脉高压发生发展中, 对肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖和迁移的作用及机制。方法 PASMCs 体外培养, 分别经低氧模拟肺动脉高压体外环境、转染 si-Ddx17 干扰 DDX17 表达、胰岛素恢复 mTORC1 活性。设置分组: PASMCs 正常培养组(CON 组); PASMCs 缺氧组(Hy 组); 正常培养组 PASMCs+si-Ddx17(si-Ddx17 组); 缺氧组 PASMCs+si-Ddx17(Hy+si-Ddx17 组); 缺氧组 PASMCs+胰岛素(Hy+insulin 组); 缺氧组 PASMCs+si-Ddx17+胰岛素(Hy+si-Ddx17+insulin 组)。增殖细胞核抗原(Ki-67)免疫荧光染色检测 PASMCs 增殖能力, 划痕及 transwell 实验检测 PASMCs 迁移能力。Western blotting 检测 DDX17、4EBP1、S6、p-4EBP1、p-S6 蛋白水平变化。通过腹腔注射野百合碱(MCT)诱导小鼠肺动脉高压形成, 转染 AD-Ddx17i 沉默体内 DDX17 的表达后, 采用 HE 染色实验评估小鼠肺血管的形态。**结果** 与 CON 组相比, Hy 组 PASMCs 的增殖及迁移能力增强( $P<0.01$ )且 p-4EBP1、p-S6 蛋白的表达升高( $P<0.01$ ); 与 Hy 组相比, Hy+si-Ddx17 组 PASMCs 的增殖及迁移能力明显降低( $P<0.05$ ); 与 Hy 组相比, Hy+si-Ddx17 组 p-4EBP1、p-S6 蛋白的表达降低( $P<0.05$ )。与 Hy+si-Ddx17 组相比, Hy+si-Ddx17+insulin 组增殖及迁移能力增强( $P<0.05$ )。在 MCT 诱导的肺动脉高压小鼠体内转染 AD-Ddx17i 后, 肺血管腔狭窄及内膜增生均有所减轻。**结论** 本研究发现在缺氧诱导的 PASMCs 和 MCT 诱导的肺动脉高压小鼠中 DDX17 的表达均升高, 干扰 DDX17 的表达后可明显抑制 PASMCs 的增殖、迁移及肺动脉高压小鼠的肺血管的重构, 其机制与 mTORC1 活性降低有关。

**关键词:** DDX17; 肺动脉高压; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖; 迁移; mTORC1

## Silencing DDX17 inhibits proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells *in vitro* by decreasing mTORC1 activity

DENG Xiangxiang<sup>1,2</sup>, WANG Jia<sup>2,3</sup>, XIONG Mi<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>2</sup>, YANG Yongjian<sup>2</sup>, LI De<sup>2</sup>, SUN Xiongshan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine, School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Western Theater Command General Hospital, Chengdu 610083, China; <sup>3</sup>School of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of DDX17 for regulating proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) during the development of pulmonary hypertension (PH). **Methods** In murine PASMCs cultured under normoxic or hypoxic conditions, the effects of transfection with si-Ddx17 and insulin treatment, alone or in combination, on cell proliferation and migration were evaluated using Ki-67 immunofluorescence staining, scratch assay and Transwell assay. Western Blotting was performed to detect the changes in protein expression levels of DDX17, 4EBP1, S6, p-4EBP1, and p-S6. In a mouse model of PH induced by intraperitoneal injection of monocrotaline (MCT), the changes in pulmonary vasculature were examined using HE staining following tail vein injection of AD-Ddx17i. **Results** The PASMCs in hypoxic culture exhibited significantly enhanced cell proliferation and migration and protein expressions of p-4EBP1 and p-S6, and these changes were obviously reversed by transfection with si-Ddx17. Treatment with insulin significantly attenuated the effect of si-Ddx17 against hypoxic exposure-induced changes in PASMCs. In the mouse model of MCT-induced PH, transfection with AD-Ddx17i obviously alleviated pulmonary vascular stenosis and intimal hyperplasia. **Conclusion** The expression of DDX17 is elevated in hypoxia-induced PASMCs and PH mice, and silencing DDX17 significantly inhibits PASMC proliferation and migration *in vitro* and pulmonary vascular remodeling in PH mice by reducing mTORC1 activity.

**Keywords:** DDX17; pulmonary hypertension; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation; migration; mTORC1

肺动脉高压(PH)是一种多种原因引起的血流动力学及病理生理学疾病,其诊断标准为静息时平均肺动脉压增加超过或等于 20 mmHg<sup>[1]</sup>。目前肺动脉高压最常见的临床分型分有 5 类:动脉性肺动脉高压;左心疾病相关的肺动脉高压;合并肺部疾病和/或缺氧的肺动脉

高压;慢性肺动脉阻塞相关的肺动脉高压;机制不明和/或多因素的肺动脉高压<sup>[2]</sup>。尽管肺动脉高压有相应的靶向治疗,如钙通道阻滞剂、前列环素类似物(PCA)、内皮素 A 和 B 受体拮抗剂(ERA)、内皮素 A 和 B 受体拮抗剂(ERA)和可溶性鸟苷酸环化酶激动剂<sup>[3]</sup>,但 3 年生存率仅为 68%~70%<sup>[4]</sup>,其 5 年死亡率高达 50%<sup>[5]</sup>。因此探索肺动脉高压的生理病理机制以及寻找新型的治疗方式具有重要的意义。

DEAD-box (DDX) 17 是 DEAD-box RNA 解旋酶

收稿日期:2025-03-15

基金项目:西部战区总医院星火创新人才项目基金(5156Z162)

作者简介:邓湘湘,硕士,E-mail:xiangd19999@163.com

通信作者:孙雄山,副主任医师,博士,E-mail:shan19910927@sina.com

家族中的关键成员之一,位于人类染色体22q13.1,在转录和翻译修饰后产生两种相对分子质量分别为72 000和82 000的稳定蛋白,这些蛋白分别称为p72和p82,包含650和729个氨基酸<sup>[6]</sup>,参与炎症小体的激活<sup>[7]</sup>、细胞内RNA结构调控<sup>[8]</sup>、肿瘤的发生发展<sup>[9]</sup>、氧化还原代谢和细胞迁移/侵袭等调控<sup>[10]</sup>。既往研究表明,DDX17可促进多种癌细胞生长、迁移和侵袭<sup>[11-14]</sup>,且在循环系统中起着重要作用,如可以通过促进线粒体稳态来保护心脏功能<sup>[15]</sup>、抑制雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )的激活减少阿霉素(DOX)诱导的心肌细胞凋亡<sup>[16]</sup>,作为心脏生理肥大相关调节因子(CPhar)的结合伴侣对心脏起保护作用<sup>[17]</sup>,介导SFRP4/Wnt/ $\beta$ -catenin轴调节促进脂肪组织来源的间充质干细胞(ADMSC)分化为心肌细胞<sup>[18]</sup>。但目前DDX17在PASCs中的表达及功能尚未见明确报道。本研究通过低氧培养PASCs模拟肺动脉高压体外环境,转染特异性si-RNA干扰DDX17的表达,探究DDX17在PH发生发展和PASCs增殖及迁移中的调控机制,以期改善及治疗PH提供新的治疗靶方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

40只C57BL/6J野生型雄性小鼠,体质量20~25 g,6~8周龄,购买自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证编号:SCKY(京)2019-0010;C57BL/6J小鼠饲养于25℃恒温,常规饲料和自由饮水,以及12 h光照/黑暗交替循环的屏障环境中,动物实验符合伦理审批(伦理批号:2023EC5-ky065)。

### 1.2 实验细胞和主要试剂

小鼠肺动脉平滑肌细胞系PASCs(深圳豪地华拓公司),磷酸盐缓冲液、DMEM高糖培养基及0.25%胰蛋白酶(成都米地科生物科技有限公司),青霉素-链霉素溶液、特级胎牛血清(成都国教科技有限公司),RT-qPCR试剂盒(Takara),内参及目的基因引物(生工生物),4E结合蛋白1(4EBP1)抗体、磷酸化4EBP1(p-4EBP1)抗体、核糖体蛋白S6(S6)抗体、磷酸化S6(p-S6)抗体(CST),Ki-67抗体(北京博奥森生物有限公司),重组人胰岛素(Solarbio),MCT(MCE),si-*Ddx17*(5'-GCACCAUCCUUAUUGCUATT-3')、NC-siRNA(5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')<sup>[19]</sup>,引物合成及购买于苏州吉玛基因股份有限公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及干预 PASCs在含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM高糖培养基培养,每隔2~3 d换液,待细胞密度培养至90%左右时,用0.25%胰酶进行消化,1:3进行传代培养,选择对数生长期细胞(3~5代)进行后续实验。为构建肺动脉高压模型,将PASCs在

缺氧(2% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>培养箱)中37℃培养,诱导PASCs体外增殖和迁移。为进一步干扰DDX17表达,待细胞密度至60%左右时进行转染si-RNA,分为2组:NC-siRNA组(转染NC的siRNA)、siRNA-*Ddx17*组(转染靶向DDX17的siRNA),先稀释转染试剂及si-RNA,用无血清的培养基分别与Lipofectamine和si-RNA各自混合均匀,siRNA终浓度为50 nmol/L,再将稀释好的si-RNA溶液逐滴加入到转染试剂溶液中,于室温下孵育20~30 min,最后将混合液加入6孔板中,采用无血清培养基,培养6 h后换成完全培养基继续孵育。为进一步探究DDX17是否通过mTORC1调节PASCs增殖及迁移,在干扰DDX17表达后,向相应的组别中加入人重组胰岛素(5 mg/L)孵育24 h。

1.3.2 RT-qPCR检测DDX17的mRNA表达 根据试剂盒的说明书,使用TRIzol法提取PASCs的总RNA,将RNA逆转录为cDNA后扩增。所有引物均由生工生物合成,引物序列如下:GAPDH上游序列为5'-AACTT TGGCATTGTGGAAGG-3',下游序列为5'-ACACATT GGGGGTAGGAACA-3';DDX17上游序列为5'-TATG GAAGCCCAAATTCTGC-3',下游序列为5'-CAGATC GGCCTATCCCACTA-3'<sup>[15]</sup>。

1.3.3 Western blotting检测DDX17及mTORC1下游靶蛋白水平 按照蛋白提取试剂盒提取各组细胞及组织蛋白,用BCA法测量各种蛋白浓度。取适量蛋白样本进行SDS-PAGE电泳分离,聚偏二氟乙烯膜转膜、牛血清白蛋白封闭,加入对应一抗(DDX17、p-S6、p-4EBP1、S6、4EBP1和 $\beta$ -tublin),4℃孵育过夜。次日复温1 h后,用缓冲液清洗条带,然后加入山羊抗兔II抗(稀释比为1:5000),孵育1 h后,用缓冲液洗涤,接着加入ECL化学发光液显色,最后通过ImageJ分析条带。

1.3.4 Ki-67细胞免疫荧光染色检测PASCs增殖能力 待6孔板爬片上细胞长至合适密度时,倒掉培养液,依次使用PBS清洗后加入4%多聚甲醛固定30 min;固定结束后倒除多聚甲醛,用PBS浸洗后每孔加入1 mL的免疫染色通透液作用10~15 min,结束后用5% BSA封闭30 min,再加入Ki-67 I抗(稀释比为1:500)4℃孵育过夜,次日复温30 min,吸出I抗,用PBS清洗后加入荧光II抗(bs-0295G-FITC,稀释比:1:500),避光条件下室温孵育1 h,吸出II抗,PBS再次清洗后加DAPI染液约200  $\mu$ L避光室温孵育5 min,吸出DAPI染液,用PBS清洗,用抗荧光淬灭剂封片,并在荧光显微镜下观察图像,记录Ki-67阳性细胞率。

1.3.5 Transwell实验检测PASCs迁移能力 将PASCs消化后接种于12孔板中(约 $8 \times 10^3$ /孔),上室加入300  $\mu$ L无血清细胞混悬液,下室加入500  $\mu$ L含有30%胎牛血清的培养基。待迁移24 h后,倒掉上室中多

余培养基,使用4%的多聚甲醛进行固定20 min后,用PBS清洗1遍,轻轻擦拭上室中的上层细胞,用0.1%的结晶紫对下层细胞进行染色,PBS清洗后在显微镜下进行观察,随机选取5个视野计数迁移细胞。

**1.3.6 划痕实验检测 PSMCs 迁移能力** 用记号笔在6孔板背面划横线,大约每隔1 cm均匀划一条横线,每个孔划3条。将呈对数生长的PSMCs消化后,铺适量细胞于6孔板中,待细胞增殖到90%左右,用无菌的规格为100  $\mu$ L吸头垂直于竖线划一道痕,随后用PBS洗涤细胞2遍,加入无血清培养基,拍摄时间点为0 h的细胞,放入常氧或低氧细胞培养箱中继续培养,于24 h后用光学显微镜拍照,以划痕的宽窄变化快慢测量细胞迁移率。

**1.3.7 小鼠肺动脉高压模型的建立** 将40只C57BL/6J野生型小鼠饲养1周后随机分为对照组、MCT组、对照组+AD-*Ddx17*组、MCT+AD-*Ddx17*组,10只组。MCT处理组小鼠每周1次腹腔注射600 mg/kg<sup>[20]</sup> MCT并维持8周,为了干扰小鼠体内DDX17的表达,在小鼠注射MCT第4周时,对照组和MCT组尾静脉注射阴性对照腺病毒AD-NC,对照组+AD-DDX17组和MCT+AD-

DDX17组转染腺病毒AD-DDX17,此后每周追加注射腺病毒,在最后1次腹腔注射MCT的第8天进行取材。

**1.3.8 HE染色** 首先在37  $^{\circ}$ C的恒温箱中烤片1~2 h,接着将切片放入二甲苯I、二甲苯II中脱蜡,每次15 min,之后将切片放入100%、95%、90%、80%、70%乙醇溶液中进行水化后用蒸馏水冲洗,使切片恢复到水相环境。再将切片放入苏木精染液中染色5~10 min,用流水冲洗切片后再将切片放入伊红染液中染色2~3 min,最后进行脱水、透明,然后滴加中性树胶,用盖玻片封片,进行肺血管壁厚度统计。

**1.3.9 统计学分析** 应用GraphPad Prism 9软件进行数据统计处理。所有数据均用均数 $\pm$ 标准差表示,多组样本之间的对比运用单因素方差分析,对于配对样本,则采用*t*检验,以*P*<0.05时为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DDX17在缺氧培养的PSMCs中表达升高

qPCR和Western blotting实验结果显示,缺氧组DDX17的mRNA水平和DDX17蛋白表达与对照组相比,明显升高(*P*<0.01,图1)。

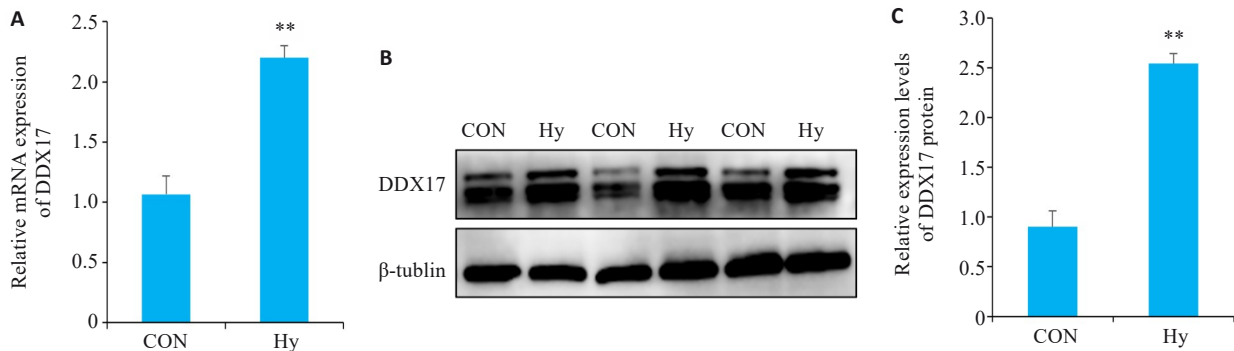


图1 低氧对PSMCs中DDX17表达的影响

Fig.1 Effect of hypoxia on DDX17 mRNA (A) and protein expression level (B, C) in PSMCs (*n*=3, Mean $\pm$ SD). \*\**P*<0.01 vs CON group.

### 2.2 干扰DDX17表达可抑制PSMCs增殖和迁移

Western blotting实验结果显示沉默组DDX17的表达下降(*P*<0.05,图2A、B),划痕实验结果显示,与对照组相比,缺氧组细胞划痕愈合速度增快(*P*<0.01),而降低DDX17表达后,这种增快被削弱(*P*<0.05,图2C、D)。Transwell迁移实验结果与划痕一致,缺氧24 h处理后,缺氧组细胞迁移数量与对照组相比,明显增加(*P*<0.01);缺氧+si-*Ddx17*组细胞迁移数量与缺氧组相比,明显减少(*P*<0.01,图2E、F)。Ki-67免疫荧光染色显示,和对照组相比,缺氧显著增高了Ki-67阳性细胞率(*P*<0.01),干扰DDX17的表达后,Ki-67阳性细胞率增加被抑制(*P*<0.05,图2G、H)。

### 2.3 干扰DDX17的表达降低了mTORC1的活性

Western blotting实验结果显示,与对照组相比,

缺氧处理后,mTORC1的关键底物p-4EBP1和p-S6蛋白水平显著增加,而干扰DDX17的表达后,缺氧组p-4EBP1和p-S6蛋白水平均有所降低(*P*<0.05,图3)。

### 2.4 沉默DDX17通过降低mTORC1活性发挥其对PSMCs增殖、迁移的抑制作用

Western blotting实验结果显示(图4A~C),缺氧+si-*Ddx17*组的p-4EBP1和p-S6蛋白表达量较缺氧组低(*P*<0.05);缺氧+si-*Ddx17*+胰岛素组的p-4EBP1和p-S6蛋白表达量较缺氧+si-*Ddx17*组升高(*P*<0.05)。划痕实验显示(图4D、E),与缺氧组相比,缺氧+si-*Ddx17*组细胞划痕愈合速度减慢(*P*<0.01);与缺氧+si-*Ddx17*组相比,缺氧+si-*Ddx17*+胰岛素组划痕愈合速度增快(*P*<0.05)。Transwell迁移实验结果显示(图4F、G),与缺氧组相比,缺氧+si-*Ddx17*组细胞迁移数量减少

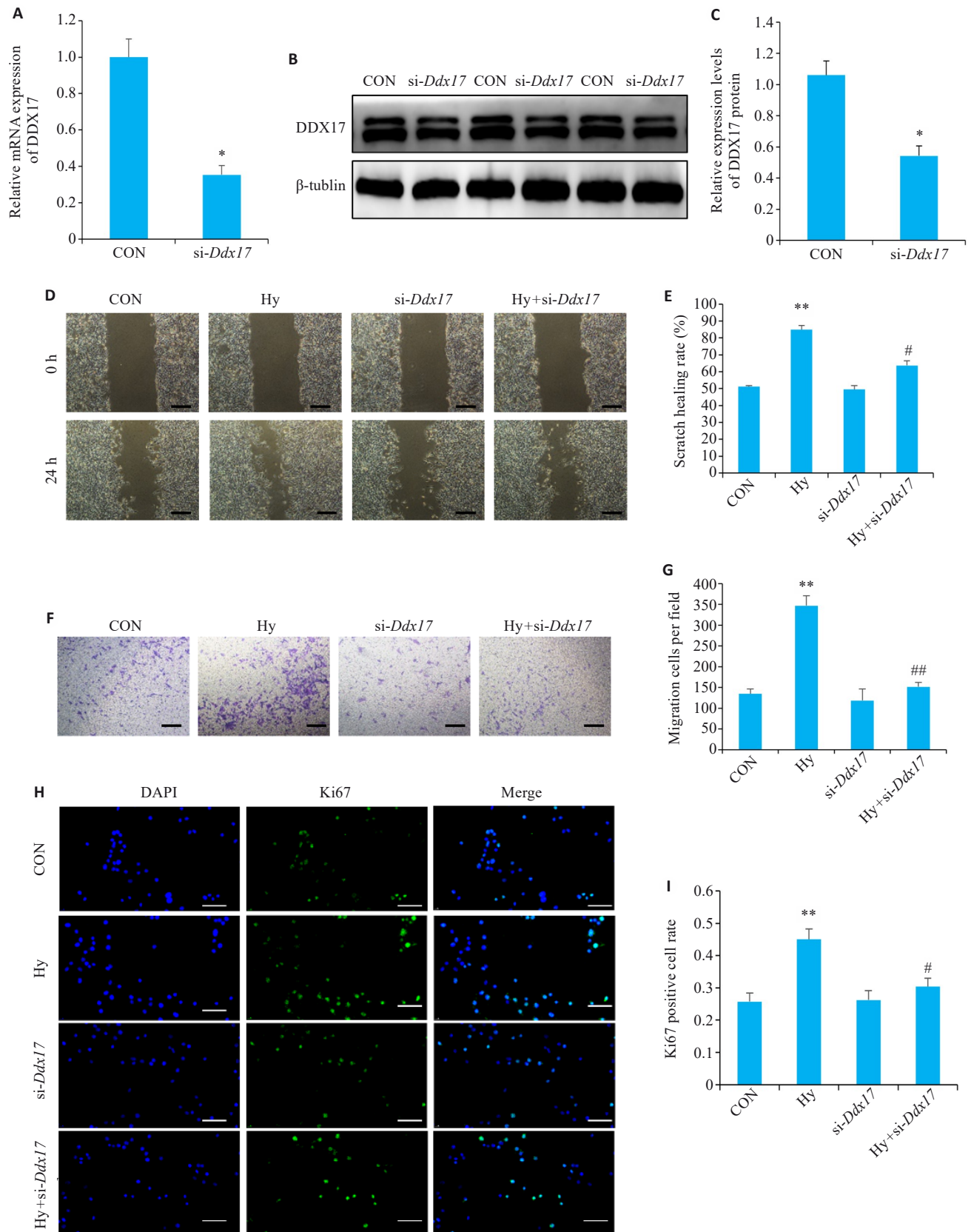


图2 低氧条件下DDX17对PASCs增殖及迁移的影响

Fig.2 Effect of DDX17 silencing on proliferation and migration of PSMCs exposed to hypoxia (n=3, Mean±SD). A: DDX17 mRNA level in PSMCs. B, C: Protein expression level of DDX17 in PSMCs. D, E: Scratch healing assay for assessing changes in migration of PSMCs after the treatments (scale bar=100 μm). F, G: Transwell assay for assessing changes in migration ability of PSMCs after the treatments (scale bar=100 μm). H, I: Results of immunofluorescence staining of Ki-67 for assessing proliferative ability of PSMCs (scale bar=200 μm). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs CON group; #P<0.05, ##P<0.01 vs Hy group.

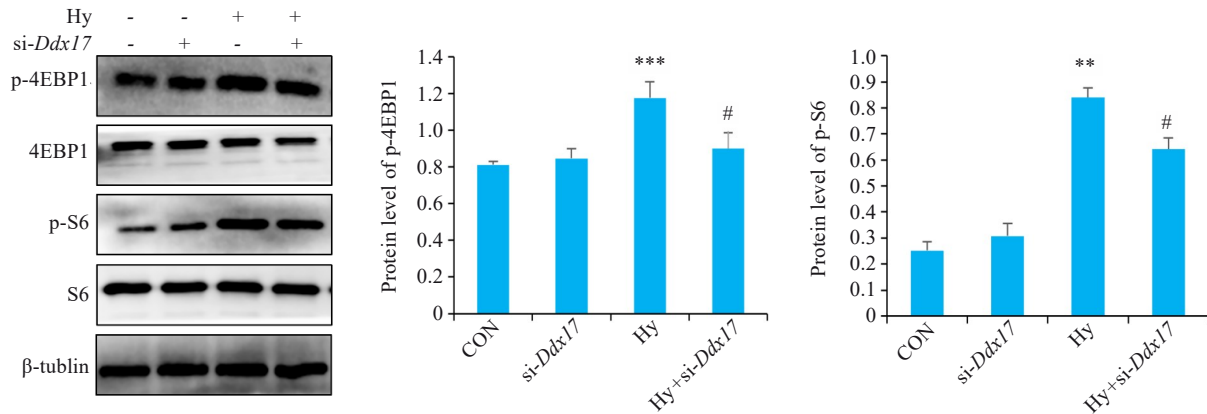


图3 DDX17对缺氧诱导的PSMCs中mTORC1活性的影响

Fig.3 Effect of DDX17 silencing on mTORC1 activity in hypoxia-induced PSMCs ( $n=3$ , Mean $\pm$ SD). \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs CON group; # $P<0.05$  vs Hy group.

( $P<0.05$ );与缺氧+si-Ddx17组相比,缺氧+si-Ddx17+胰岛素组细胞迁移数量增加( $P<0.01$ )。Ki-67免疫荧光染色结果显示(图4H、I),缺氧+si-Ddx17组与缺氧组相比,Ki-67阳性细胞率减少( $P<0.01$ );与缺氧+si-Ddx17组相比,缺氧+si-Ddx17+胰岛素组Ki-67阳性细胞率增加( $P<0.01$ )。

### 2.5 干扰DDX17表达抑制MCT诱导肺动脉高压小鼠肺动脉新生内膜增生

Western blotting实验发现,与对照组相比,MCT组小鼠血管中DDX17的表达升高,与MCT组相比,MCT+AD-Ddx17i组DDX17的表达降低( $P<0.05$ ,图5A、B)。通过HE实验显示,MCT诱导后,血管管腔明显狭窄,新生内膜增厚;沉默DDX17后,管腔狭窄及内膜增生有所减轻(图5C、D)。

## 3 讨论

PH是一种严重的肺血管疾病,其特征是血管平滑肌细胞过度增殖、细胞外基质沉积增加以及炎症细胞在肺血管系统壁内积累,从而导致肺血管阻力增加<sup>[21]</sup>,血管顺应性下降<sup>[22]</sup>。然而目前肺动脉高压的疗法主要针对肺血管收缩,不能有效干预或逆转肺动脉血管重塑<sup>[23]</sup>。因此,亟待新的探索来解决PH中肺动脉的病理重塑。本研究通过干扰DDX17的表达,探讨DDX17对小鼠PSMCs增殖、迁移的调控及有关机制。

DDX17属于DEAD-box RNA解旋酶家族,是细胞核和细胞质穿梭蛋白。DEAD-box蛋白在C端具有富含精氨酸和甘氨酸(RG)的区域<sup>[24]</sup>,而DDX17在哺乳动物特异性C端延伸(CTE)中有一个富含脯氨酸的区域<sup>[25]</sup>,富含脯氨酸的区域通常可以介导蛋白质-蛋白质相互作用<sup>[26]</sup>。他们在大多数组织和细胞中表达,并参与正常生理功能的调节<sup>[6]</sup>。既往研究发现DDX17通过与Hippo信号通路的下游靶点YAP相互作用促进肿瘤细胞增殖<sup>[27]</sup>。还有研究发现<sup>[13]</sup> DDX17通过表达可以促进

MYC转录激活,从而促进肝细胞癌的迁移和侵袭。此外还有研究发现DDX17可以通过miR-149-3p/CYBRD1通路促进结肠癌细胞的转移<sup>[12]</sup>。以上研究均表明DDX17在多种细胞增殖及迁移方面发挥重要作用。由于PSMCs的增殖及迁移是PH发生发展的关键环节,因此我们验证了DDX17在PSMCs的表达,观察到缺氧组中DDX17表达明显增加,而干扰DDX17表达后,PSMCs的增殖和迁移能力受到抑制,说明DDX17正相调控PSMCs的增殖和迁移过程,然而调控的具体分子机制尚不清楚。

mTOR是位于PI3K-AKT信号通路下游的丝氨酸/苏氨酸激酶,在细胞生长、代谢、增殖、分化等生理过程中起关键作用<sup>[28]</sup>。mTORC1是其发挥作用的关键蛋白复合物之一<sup>[29]</sup>,可以通过磷酸化调节核糖体、mRNA、蛋白质合成及翻译等过程,增强细胞增殖和生长<sup>[30]</sup>。既往大量研究发现mTORC1信号的激活可以导致PSMCs增殖和促进随后的PH发展<sup>[31]</sup>,是肺动脉高压形成的关键步骤<sup>[32,33]</sup>,而抑制mTORC1可以减弱PH的发展<sup>[34]</sup>。而DDX17作用功能十分强大,几乎可以参与RNA代谢的所有过程<sup>[6]</sup>、介导蛋白质相互作用<sup>[26]</sup>,因此,我们猜测DDX17是否可以通过mTORC1影响肺动脉高压的进展。我们首先研究了DDX17与mTORC1的关系,众所周知,核糖体蛋白S6激酶(S6)和真核翻译起始因子4E结合蛋白1(4EBP1)是mTORC1的两个关键底物,我们发现降低DDX17的表达后,S6和4EBP1的磷酸化水平均降低,提示mTORC1活性受到了限制。为了进一步探索mTORC1在DDX17调控PSMCs功能中的作用,我们加入胰岛素恢复mTORC1活性后<sup>[35]</sup>,结果显示p-S6和p-4EBP1表达明显升高。在mTORC1活性恢复后,DDX17表达降低对PSMCs增殖及迁移的抑制效果被逆转,由此我们证明沉默DDX17可能通过降低mTORC1活性从而抑制小鼠PSMCs增殖及迁移,但

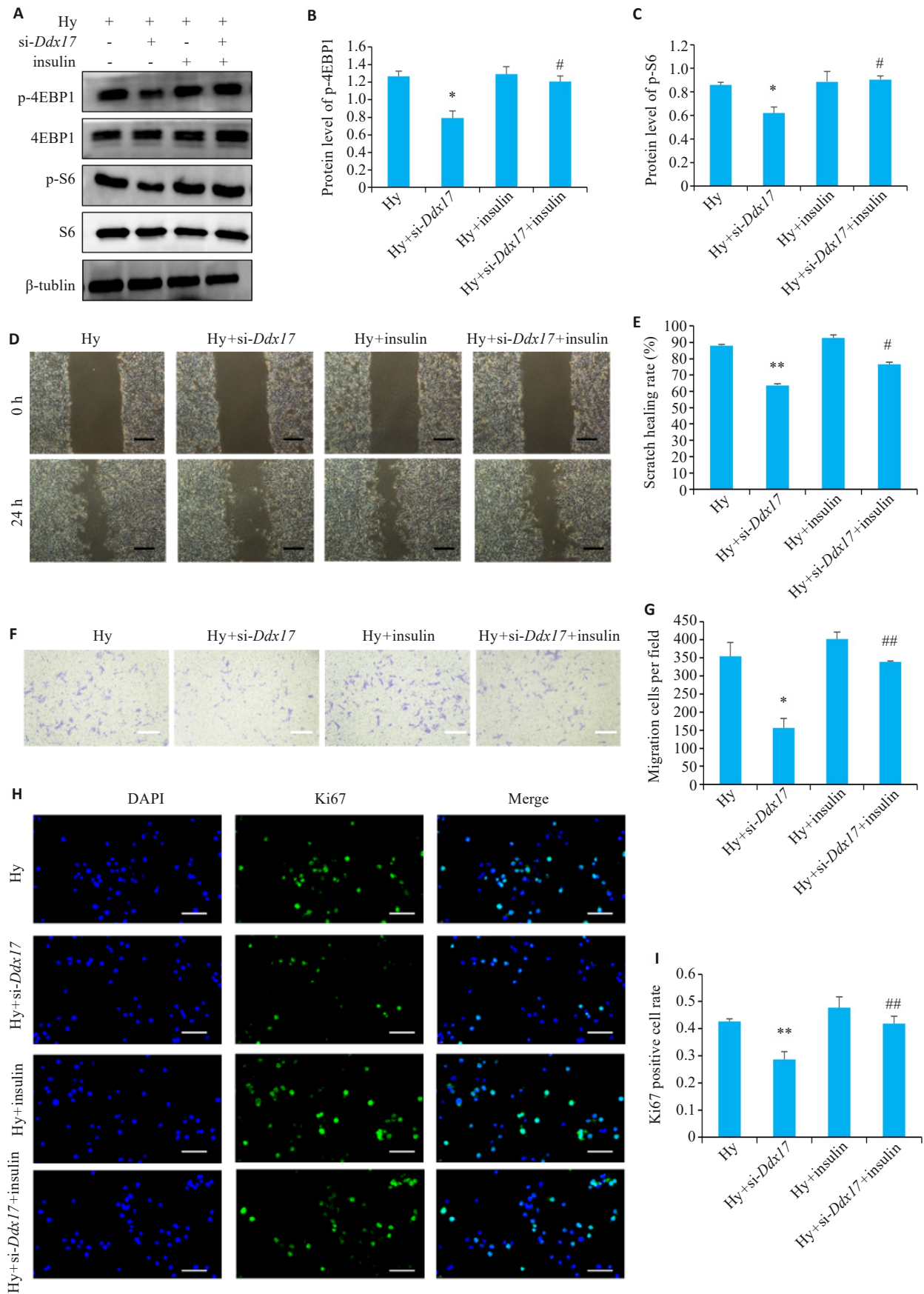


图4 mTORC1在DDX17沉默介导的PSMCs增殖和迁移抑制中的作用

Fig.4 Role of mTORC1 in DDX17 silencing-mediated inhibition of proliferation and migration of PSMCs ( $n=3$ , Mean±SD). A-C: Protein levels of p-4EBP1 and p-S6 in the cells detected using Western blotting. D, E: Scratch healing assay for assessing migration ability of PSMCs (scale bar=100 μm). F, G: Transwell assay for assessing migration ability of PSMCs (scale bar=100 μm). H, I: Immunofluorescence staining of Ki-67 for assessing proliferative ability of PSMCs (scale bar=200 μm). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Hy group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs Hy+si-Ddx17 group.

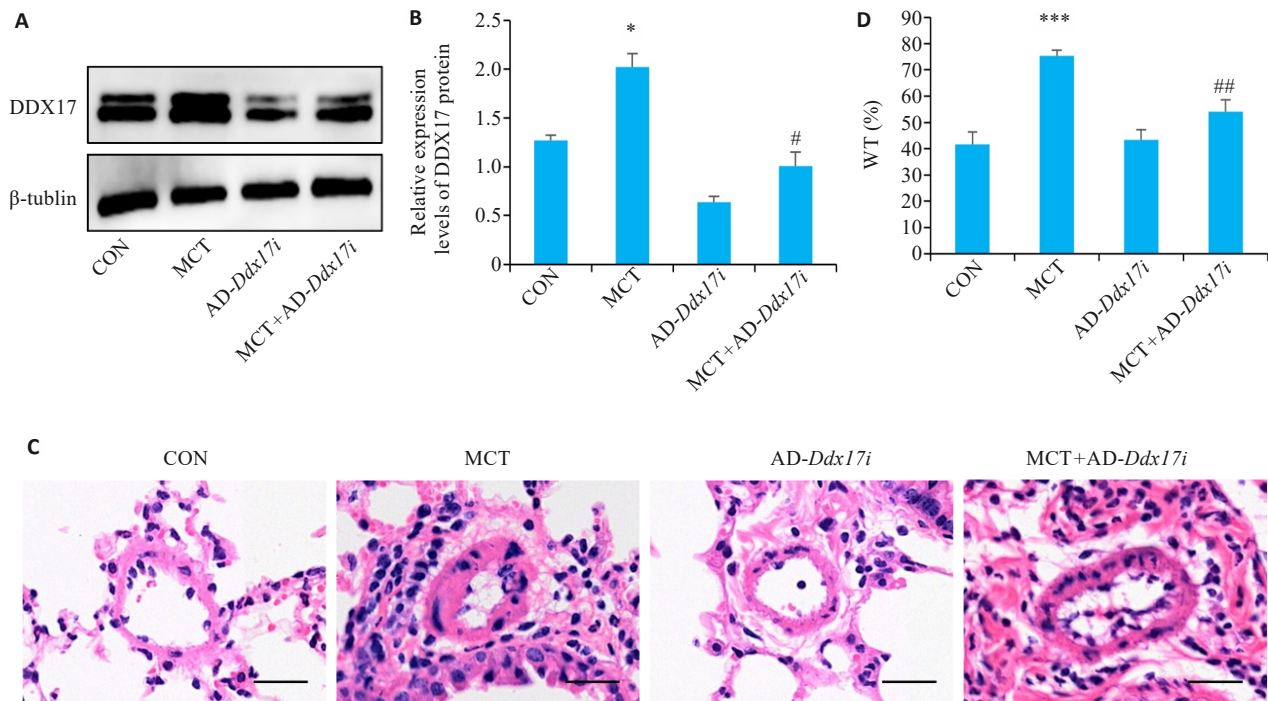


图5 干扰DDX17表达减轻了MCT诱导的肺血管重构

Fig. 5 DDX17 silencing ameliorates MCT-induced pulmonary vascular remodeling in mice ( $n=3$ , Mean $\pm$ SD). A, B: Protein levels of DDX17 in the pulmonary artery of the mice detected using Western blotting. C: Morphological changes in pulmonary arteries of the mice (HE staining,  $\times 40$ ). D: Percentage of pulmonary wall thickness/total thickness in the mice in different groups; \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  vs CON group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs MCT group.

DDX17影响mTORC1活性的具体机制尚不清楚,我们猜测DDX17可能通过影响mTORC1上游一些分子的转录来实现这一作用。如:RHEB是mTORC1上游的主要活性调节分子<sup>[36]</sup>,DDX17可以通过促进RHEB的转录去增强mTORC1的活性;TSC1是抑制mTORC1活性的调节分子<sup>[37]</sup>,DDX17可能通过抑制TSC1的转录来提高mTORC1的活性,因此还需进一步的研究。

为了进一步验证DDX17在体内肺动脉高压形成的作用,我们建立了小鼠肺动脉高压的模型,结果发现肺动脉高压组小鼠DDX17表达显著升高,说明DDX17在肺动脉高压形成过程中可能发挥某种作用。沉默DDX17后,我们发现肺血管管腔狭窄程度减轻,因此推断沉默DDX17可以抑制小鼠肺血管平滑肌细胞增殖迁移及血管重构。

综上所述,沉默DDX17表达,可能通过降低mTORC1活性来抑制肺血管平滑肌细胞增殖与迁移,从而抑制肺动脉高压的进展。本研究为肺动脉高压的防治提供了新的思路,但其深入分子机制还有待于进一步研究。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

[1] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary

hypertension[J]. Eur Respir J, 2019, 53(1): 1801913.

- [2] Hoepfer MM, Badagliacca R, Berger RMF, et al. Developed by the task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS). [J]. Eur Heart J, 2023, 44(15):1312.
- [3] Maron BA, Galiè N. Pulmonary Arterial Hypertension Diagnosis, Treatment, and Clinical Management in the Contemporary Era[J]. JAMA Cardiol, 2016, 1(9): 1056-1065.
- [4] Hurdman J, Condliffe R, Elliot CA, et al. ASPIRE registry: assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a REferral centre[J]. Eur Respir J, 2012, 39(4): 945-55.
- [5] Zheng R, Xu T, Wang X, et al. Stem cell therapy in pulmonary hypertension: current practice and future opportunities[J]. Eur Respir Rev, 2023, 32(169): 230112.
- [6] Xu K, Sun S, Yan M, et al. DDX5 and DDX17-multifaceted proteins in the regulation of tumorigenesis and tumor progression[J]. Front Oncol, 2022, 12: 943032.
- [7] Wang SB, Narendran S, Hirahara S, et al. DDX17 is an essential mediator of sterile NLRC4 inflammasome activation by retro-transposon RNAs[J]. Sci Immunol, 2021, 6(66): eabi4493.
- [8] Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, et al. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA sra are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 547-60.
- [9] Liu H, Gao X, Zhang W, et al. DDX17-mediated upregulation of CXCL8 promotes hepatocellular carcinoma progression via co-activating  $\beta$ -catenin/NF- $\kappa$ B complex[J]. Int J Biol Sci, 2025, 21(3): 1342-60.
- [10] Fuller-Pace FV. DEAD box RNA helicase functions in cancer[J].

- RNA Biol, 2013, 10(1): 121-32.
- [11] Liu X, Li L, Geng C, et al. DDX17 promotes the growth and metastasis of lung adenocarcinoma[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 425.
- [12] Zhao G, Wang Q, Zhang Y, et al. DDX17 induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis through the miR-149-3p/CYBRD1 pathway in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 1.
- [13] Zhou HZ, Li F, Cheng ST, et al. DDX17-regulated alternative splicing that produced an oncogenic isoform of PNX-AS1 to promote HCC metastasis[J]. Hepatology, 2022, 75(4): 847-65.
- [14] Wu XC, Yan WG, Ji ZG, et al. Long noncoding RNA SNHG20 promotes prostate cancer progression via upregulating DDX17[J]. Arch Med Sci, 2021, 17(6): 1752-65.
- [15] Yan M, Gao J, Lan M, et al. DEAD-box helicase 17 (DDX17) protects cardiac function by promoting mitochondrial homeostasis in heart failure[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 127.
- [16] Lin B, Wang F, Wang J, et al. The protective role of p72 in doxorubicin-induced cardiomyocytes injury *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3376-80.
- [17] Gao R, Wang L, Bei Y, et al. Long noncoding RNA cardiac physiological hypertrophy-associated regulator induces cardiac physiological hypertrophy and promotes functional recovery after myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2021, 144(4): 303-17.
- [18] Liu GB, Cheng YX, Li HM, et al. Ghrelin promotes cardiomyocyte differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by DDX17-mediated regulation of the SFRP4/Wnt/ $\beta$ -catenin axis[J]. Mol Med Rep, 2023, 28(3): 164.
- [19] He C, Zhang G, Lu Y, et al. *DDX17* modulates the expression and alternative splicing of genes involved in apoptosis and proliferation in lung adenocarcinoma cells[J]. PeerJ, 2022, 10: e13895.
- [20] Sun X, Nakajima E, Norbrun C, et al. Chitinase 3 like 1 contributes to the development of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. JCI Insight, 2022, 7(18): e159578.
- [21] Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, et al. Translational advances in the field of pulmonary hypertension. from cancer biology to new pulmonary arterial hypertension therapeutics. targeting cell growth and proliferation signaling hubs[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(4): 425-37.
- [22] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. BMJ, 2018, 360: j5492.
- [23] Song Y, Jia H, Ma Q, et al. The causes of pulmonary hypertension and the benefits of aerobic exercise for pulmonary hypertension from an integrated perspective[J]. Front Physiol, 2024, 15: 1461519.
- [24] Yang Q, Jankowsky E. ATP- and ADP-dependent modulation of RNA unwinding and strand annealing activities by the DEAD-box protein DED1[J]. Biochemistry, 2005, 44(41): 13591-601.
- [25] Xing Z, Ma WK, Tran EJ. The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA helicases[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2019, 10(2): e1519.
- [26] Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains[J]. FASEB J, 2000, 14(2): 231-41.
- [27] Mori M, Triboulet R, Mohseni M, et al. Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer[J]. Cell, 2014, 156(5): 893-906.
- [28] Sun Q, Chen X, Ma J, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(10): 4129-34.
- [29] Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling[J]. Cell Res, 2007, 17(8): 666-81.
- [30] Ayuk SM, Abrahamse H. mTOR signaling pathway in cancer targets photodynamic therapy *in vitro*[J]. Cells, 2019, 8(5): E431.
- [31] Houssaini A, Abid S, Derumeaux G, et al. Selective tuberous sclerosis complex 1 gene deletion in smooth muscle activates mammalian target of rapamycin signaling and induces pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 55(3): 352-67.
- [32] He Y, Zuo C, Jia D, et al. Loss of DP1 aggravates vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension via mTORC1 signaling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 201(10): 1263-76.
- [33] Goncharova EA, Simon MA, Yuan JX. mTORC1 in pulmonary arterial hypertension. At the crossroads between vasoconstriction and vascular remodeling [J] ?Am J Respir Crit Care Med, 2020, 201(10): 1177-9.
- [34] Tang HY, Wu K, Wang J, et al. Pathogenic role of mTORC1 and mTORC2 in pulmonary hypertension[J]. JACC Basic Transl Sci, 2018, 3(6): 744-62.
- [35] Wang G, Chen L, Lei X, et al. Role of FLCN phosphorylation in insulin-mediated mTORC1 activation and tumorigenesis[J]. Adv Sci: Weinh, 2023, 10(17): e2206826.
- [36] Yang H, Jiang X, Li B, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40[J]. Nature, 2017, 552(7685): 368-73.
- [37] Lai M, Zou W, Han Z, et al. Tsc1 regulates tight junction independent of mTORC1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(30): e2020891118.

(编辑:余诗诗)