

[文章编号] 1000-4718(2019)06-0968-07

# CD137 信号通过有氧糖酵解途径促进小鼠肺动脉内皮细胞增殖\*

蒋美萍, 陈蕊, 刘培晶, 严金川<sup>△</sup>

(江苏大学附属医院心内科, 江苏 镇江 212001)

**[摘要]** **目的:** 探讨 CD137 信号是否通过调控有氧糖酵解途径促进小鼠肺动脉内皮细胞(PAECs)增殖。**方法:** 将小鼠 PAECs 分组如下:(1)空白对照组、同型对照组、刺激因子 TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L)、ET-1 (10 mmol/L) 和 5-HT (1  $\mu$ mol/L) 组, 各组刺激细胞 24 h;(2)选择 TNF- $\alpha$  刺激细胞 24 h 后分为对照组、CD137 激动剂组 (CD137L 重组蛋白 5 mg/L, 激动 CD137-CD137L 信号)、c-Myc 抑制剂组 (c-Myc 抑制剂 10074-G5 10  $\mu$ mol/L, DMSO 溶解, 预处理细胞 30 min, 再加入 CD137L 重组蛋白) 和 DMSO 组 (加入与 c-Myc 抑制剂组等量 DMSO 预处理细胞 30 min, 再予 CD137L 重组蛋白刺激); (3) TNF- $\alpha$  刺激细胞 24 h 后分为对照组、CD137 激动剂组和 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 组 (10 mmol/L 糖酵解抑制剂 2-DG 预处理细胞 30 min, 再加入 CD137L 重组蛋白)。分别采用流式细胞术及 Western blot 检测细胞 CD137 膜蛋白及总蛋白表达。Western blot 及酶学分析分别检测细胞己糖激酶 (HK2)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (PFKFB3) 和 c-Myc 蛋白表达及酶活性。葡萄糖氧化酶法及乳酸脱氢酶比色法检测细胞葡萄糖摄取量及乳酸水平。CCK-8 法和 EdU 法检测细胞增殖。**结果:** 与对照组相比, 刺激因子 TNF- $\alpha$ 、ET-1 及 5-HT 刺激 24 h 可明显增加 PAECs 的 CD137 膜蛋白及总蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。CD137 激动剂组细胞 HK2 及 PFKFB3 蛋白表达及酶活性显著高于对照组; CD137 激动剂组细胞乳酸水平高于对照组, 葡萄糖消耗较对照组多 ( $P < 0.05$ )。激活 CD137 信号后 PAECs 的 c-Myc 蛋白表达高于对照组, 而应用 c-Myc 抑制剂 10074-G5 可显著抑制 CD137 信号的促糖酵解作用 ( $P < 0.05$ )。CCK-8 及 EdU 增殖试验显示激活 CD137 信号可显著促进 PAECs 增殖, 有氧糖酵解抑制剂 2-DG 可抑制其促细胞增殖作用 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CD137 信号可能通过上调 c-Myc 增强小鼠 PAECs 有氧糖酵解, 进而促进细胞增殖。

**[关键词]** CD137; c-Myc 蛋白; 有氧糖酵解; 肺动脉内皮细胞; 细胞增殖**[中图分类号]** R543.2; R363.2**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.002

## CD137 signaling molecules promote proliferation of pulmonary artery endothelial cells by aerobic glycolysis

JIANG Mei-ping, CHEN Rui, LIU Pei-jing, YAN Jin-chuan

(Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China. E-mail: yanjinchuan@hotmail.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate whether CD137 signaling molecules promote the proliferation of pulmonary artery endothelial cells (PAECs) by aerobic glycolysis. **METHODS:** The experiments of mouse PAECs were performed as follows. (1) Stimulating factors TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L), ET-1 (10 mmol/L) and 5-HT (1  $\mu$ mol/L) were used to stimulate the cells for 24 h. (2) After stimulation with TNF- $\alpha$  for 24 h, the cells were divided into control group, CD137 agonist group (treatment with 5 mg/L CD137L recombinant protein to activate CD137-CD137L signaling), c-Myc inhibitor group (pretreatment with 10  $\mu$ mol/L c-Myc inhibitor 10074-G5, dissolved in DMSO, for 30 min, followed by treatment with 5 mg/L CD137L recombinant protein) and DMSO group (pretreated with DMSO at the same volume to c-Myc inhibitor group for 30 min followed by CD137L recombinant protein treatment). (3) After stimulated with TNF- $\alpha$  for 24 h, the cells were divided into control group, CD137 agonist group and 2-deoxyglucose (2-DG) group (pretreatment with 10 mmol/L glycoly-

[收稿日期] 2018-10-08

[修回日期] 2018-12-17

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81670405; No. 81400208); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20161355; BK20181227); 镇江市心血管病临床医学研究中心资助项目 (No. SS2018008); 镇江市社会发展基金资助项目 (No. SH2018043)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 0511-85026551; E-mail: yanjinchuan@hotmail.com

sis inhibitor 2-DG for 30 min followed by CD137L recombinant protein treatment). The expression of membrane protein and total protein of CD137 in the PAECs was detected by flow cytometry and Western blot, respectively. The protein levels of glycolytic enzymes such as hexokinase (HK2), 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-diphosphatase 3 (PFKFB3) and c-Myc were measured by Western blot. The enzyme activity of HK2 and PFKFB3 was detected by HK2 kit and PFK kit, respectively. Glucose oxidase method was used to measure the glucose uptake rate, and lactate colorimetric assay was conducted for analyzing lactic acid production. CCK-8 assay and EdU staining were used to detect proliferation of the PAECs. **RESULTS:** Compared with control group, TNF- $\alpha$ , ET-1 and 5-HT significantly increased the expression of CD137 membrane protein and total protein in the PAECs ( $P < 0.05$ ). The protein levels and enzyme activity of HK2 and PFKFB3 protein in CD137 agonist group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the lactic acid production and glucose consumption in CD137 agonist group were significantly increased. The protein level of c-Myc was significantly higher than that in control group after stimulation with CD137L recombinant protein, while c-Myc inhibitor 10074-G5 significantly inhibited the promoting effect of CD137L recombinant protein on glycolysis ( $P < 0.05$ ). The results of CCK-8 assay and EdU staining showed that the cell proliferation in CD137 agonist group was significantly increased compared with control group, while glycolysis inhibitor 2-DG significantly inhibited the proliferation-enhancing effect of CD137 signaling activation on the cells ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** CD137 signaling molecules may modulate the aerobic glycolysis by up-regulating c-Myc, thus promoting the proliferation of mouse PAECs.

[**KEY WORDS**] CD137; c-Myc protein; Aerobic glycolysis; Pulmonary artery endothelial cells; Cell proliferation

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种病因复杂的肺血管疾病,以肺外周小血管重塑、闭塞,肺血管阻力进行性增加为特征,最终形成右心室肥大和右心衰竭。肺动脉高压的病理特征表现为内皮细胞、平滑肌细胞和外膜成纤维细胞的过度增殖和凋亡耐受,导致肺血管管壁不断增厚,肺血管重塑<sup>[1]</sup>。内皮细胞的功能障碍是肺动脉高压的重要启动因素<sup>[2]</sup>。

细胞在氧气充足条件下的能量供应仍主要依赖效率较低的糖酵解途径,并产生大量乳酸,为细胞增殖合成 DNA 等提供大量底物,这一现象被称为“Warburg 效应”,即有氧糖酵解<sup>[3]</sup>。近年来,研究人员发现小鼠肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cells, PAECs)的类肿瘤细胞增殖与其葡萄糖能量代谢异常密切相关,主要表现为细胞有氧糖酵解增加,线粒体氧化磷酸化减少及乳酸产量增加。肺血管内皮细胞线粒体氧化磷酸化的抑制直接导致了线粒体依赖的凋亡,继而上调糖酵解从而促进了细胞促增殖表型。在 PH 模型动物中应用糖代谢调节药物二氯乙酸盐(dichloroacetate, DCA)可减轻肺血管重构,缓解 PH<sup>[4]</sup>。因此,PAECs 葡萄糖能量代谢异常可能是 PH 肺血管重构的重要病理机制之一。目前研究已经发现缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)的异常活化、骨形态发生蛋白受体 2(bone morphogenetic protein receptor 2, BMPR2)的突变及陷窝蛋白 1(caveolin-1)的缺失均可抑制线粒体的氧化磷酸化,促进 PAECs 有氧糖酵解过程<sup>[5]</sup>。然而,引起 PAECs 有氧糖酵解增强的原因及具体机制目前仍不清楚。

CD137 是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体超家族成员,主要表达在活化的免疫细胞表面,在炎症刺激下也可表达于平滑肌细胞和内皮细胞<sup>[6]</sup>。细胞表面 CD137 与其配体 CD137L 结合后激活 CD137-CD137L 信号(CD137 信号),参与机体免疫炎症、心血管疾病及肿瘤的发生<sup>[7-8]</sup>。研究发现,激活的 CD137 信号能够促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞有氧糖酵解,进而促进 T 淋巴细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>,这提示 CD137 信号可能通过介导细胞有氧糖酵解代谢,调控细胞增殖;然而,CD137 信号是否参与肺高压内皮细胞增殖、异常代谢等功能障碍目前尚不清楚。本研究以小鼠 PAECs 为研究对象,探讨 CD137 信号是否通过调控有氧糖酵解途径影响小鼠 PAECs 增殖。

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞和主要试剂

小鼠肺动脉内皮细胞购自中国科学院。DMEM 高糖培养基购自维森特生物技术(南京)有限公司;胰酶和胎牛血清购自 Gibco;CD137L 重组蛋白购自生工生物科技有限公司;TNF- $\alpha$  购自 PeproTech;2-脱氧葡萄糖(2-dexyglucose, 2-DG)、内皮素 1(endothelin-1, ET-1)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)购自 Sigma;己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)试剂盒和 6-磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase, PFK)试剂盒购于苏州科铭生物技术有限公司;葡萄糖含量检测试剂盒及乳酸含量检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;EdU 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧

云天生物技术有限公司;抗 CD137、HK2、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-diphosphatase 3, PFKFB3) 和 c-Myc 抗体购自 Abcam;抗  $\beta$ -actin 抗体购自康为公公司; c-Myc 抑制剂 10074-G5 购自 TargetMol。

## 2 主要方法

**2.1 细胞培养与实验分组** 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养小鼠 PAECs,待细胞融合至 60% 进行干预。将细胞分组如下:(1)空白对照 (control)、同型对照 (isotype control) 组 (不加任何刺激,待收集离心后与 CD137 同型抗体避光孵育 30 min)、TNF- $\alpha$  刺激组 (终浓度 10  $\mu$ g/L)、ET-1 刺激组 (终浓度 10 mmol/L) 和 5-HT 刺激组 (终浓度 1  $\mu$ mol/L),均刺激细胞 24 h。(2)待细胞融合至 60%,加入炎症因子 TNF- $\alpha$  (终浓度 10  $\mu$ g/L) 刺激 24 h 后 (诱导刺激细胞表达 CD137),分为对照组、CD137 激动剂 (CD137 agonist) 组 [加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 5 mg/L,激动 CD137-CD137L 信号)]、c-Myc 抑制剂组 [予 c-Myc 抑制剂 10074-G5 (DMSO 溶解,终浓度 10  $\mu$ mol/L) 预处理细胞 30 min 后,再加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 5 mg/L)] 和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 组 [加入与 c-Myc 抑制剂组等量 DMSO 预处理细胞 30 min,再加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 5 mg/L)];主要观察溶解 c-Myc 抑制剂 10074-G5 的 DMSO 是否对实验有影响]。(3)待细胞融合至 60% 后进行干预,加入炎症因子 TNF- $\alpha$  (终浓度 10  $\mu$ g/L) 刺激 24 h 后分为对照组、CD137 激动剂组 [加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 5 mg/L,激动 CD137-CD137L 信号)] 和 2-DG 组 [予糖酵解抑制剂 2-DG (双蒸水溶解,终浓度 10 mmol/L) 预处理细胞 30 min 后,再加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 5 mg/L)]。

**2.2 流式细胞术检测 PAECs 膜表面 CD137 蛋白的表达水平** 收集 TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L)、ET-1 (10 mmol/L) 和 5-HT (1  $\mu$ mol/L) 刺激 24 h 后的 PAECs,胰酶消化后收集细胞,离心去上清,然后以磷酸盐缓冲液洗涤,分别与藻红蛋白 (P-phycoerythrin, PE) 标记的 CD137 抗体 (0.3  $\mu$ L,  $1 \times 10^6$  个细胞) 及同型抗体室温避光孵育 30 min,筛网过滤后,取细胞悬液用 Accuri™ C6 型流式细胞仪进行表型分析,荧光信号强度代表 PAECs 膜表面 CD137 蛋白的表达水平。

**2.3 Western blot 检测各组 PAECs 中 CD137 总蛋白及糖酵解酶的蛋白水平** 收集对数生长期的细胞,加入 RIPA 裂解液,置于冰上裂解 1 h,4  $^{\circ}$ C、15 000  $\times$  g 离心 15 min,收集上清,100  $^{\circ}$ C 变性 8 min。取等量

蛋白样本,10% SDS-PAGE 分离蛋白后,以 350 mA 恒流 90 min 转印至聚偏二氟乙烯膜。将膜置于 5% 脱脂奶粉的 TBST (NaCl + KCl + Tris + Tween-20, pH 7.4) 室温封闭 1 h。再分别用相应的兔抗小鼠 CD137 (1:1 000)、HK2 (1:1 000)、PFKFB3 (1:1 000)、c-Myc (1:1 000) 及  $\beta$ -actin (1:1 000) 抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;次日用 TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,采用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000) 和山羊抗鼠 (1:5 000) 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 15 min, ECL 显色系统定影显色,运用 LANE-1D 软件扫描条带灰度值,计算目的蛋白与  $\beta$ -actin 灰度值比值,即为各蛋白相对表达水平。

**2.4 葡萄糖含量检测试剂盒和细胞乳酸含量检测试剂盒检测各组葡萄糖及乳酸水平** 收集对数生长期的细胞至离心管内,离心后弃上清,每 500 万细胞加入 1 mL 蒸馏水,超声波破碎细胞 (冰浴,功率 20%,超声 3 s,间隔 10 s,重复 30 次),95  $^{\circ}$ C 水浴 10 min (盖紧,防止水分散失),冷却后,8 000  $\times$  g,25  $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液备用,按加样表加样后于 505 nm 处测吸光度 (A) 值,根据公式计算出各组细胞葡萄糖水平。收集对数生长期的细胞至离心管内,离心后弃上清,每 500 万细胞加入 1 mL 提取液一,冰浴超声波破碎细胞 (功率 300 W,超声 3 s,间隔 7 s,总时间 3 min),于 4  $^{\circ}$ C、12 000  $\times$  g 离心 10 min,取 0.8 mL 上清液,加入 0.12 mL 提取液二,12 000  $\times$  g 离心 10 min 后取上清待测,按加样表加样后于 570 nm 处检测各组吸光值,根据公式计算各组乳酸水平。

**2.5 HK2 试剂盒和 PFK 试剂盒检测糖酵解酶活性** 收集对数生长期的细胞至离心管内,离心后弃上清,每 500 万细胞加入 1 mL 提取液,超声波破碎细胞 (冰浴,功率 20%,超声 3 s,间隔 10 s,重复 30 次),8 000  $\times$  g,4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清冰上待测,按照试剂盒加样表加样后于 340 nm 处检测各组吸光度 (A) 值。根据公式计算各组 HK2 和 PFKFB3 酶活性。

**2.6 CCK-8 试剂盒检测 PAECs 的活力** 制作标准曲线,将胰酶消化的 PAECs 接种于 96 孔板,每孔约 2 000 个细胞,培养 24 h 后换含有 0.1% 血清培养基同步化 1 d,使绝大多数细胞处于 G<sub>0</sub> 期,进行相应药物干预;停止细胞干预,向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,不要在孔中生成气泡,将培养板置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 4 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

**2.7 EdU 法检测 PAECs 增殖** 将上述 2.1 (3) 各组 PAECs 换无血清培养基同步化 2 h,加入 EdU 工作液至终浓度为 10  $\mu$ mol/L,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,孵育完成后

吸尽 DMEM, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 吸尽固定液, 3% BSA 清洗 3 遍, 加入 1 mL 0.3% Triton X-100, 室温孵育 15 min, 吸尽通透液, 用 3% BSA 清洗 3 遍, 加入反应体系 (1 × click reaction buffer 430  $\mu$ L, CuSO<sub>4</sub> 20  $\mu$ L, Azide 555 1  $\mu$ L, click additive solution 50  $\mu$ L), 室温避光孵育 30 min, 吸尽反应体系, 用 3% BSA 清洗 3 遍, 加入 1:10 稀释的 DAPI 染液。荧光显微镜下观察并拍照。

### 3 统计学处理

用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析。每组实验重复 3 次, 数据均采用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较

采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多组间多重比较采用 Bonferroni-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 CD137 在活化的小鼠 PAECs 中表达增加

流式细胞术显示, TNF- $\alpha$ 、ET-1 和 5-HT 刺激 24 h 后, 内皮细胞 CD137 的荧光强度均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 1A。Western blot 结果示, 与对照组相比, TNF- $\alpha$ 、ET-1 和 5-HT 刺激 24 h 后, 内皮细胞 CD137 总蛋白水平均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 1B。

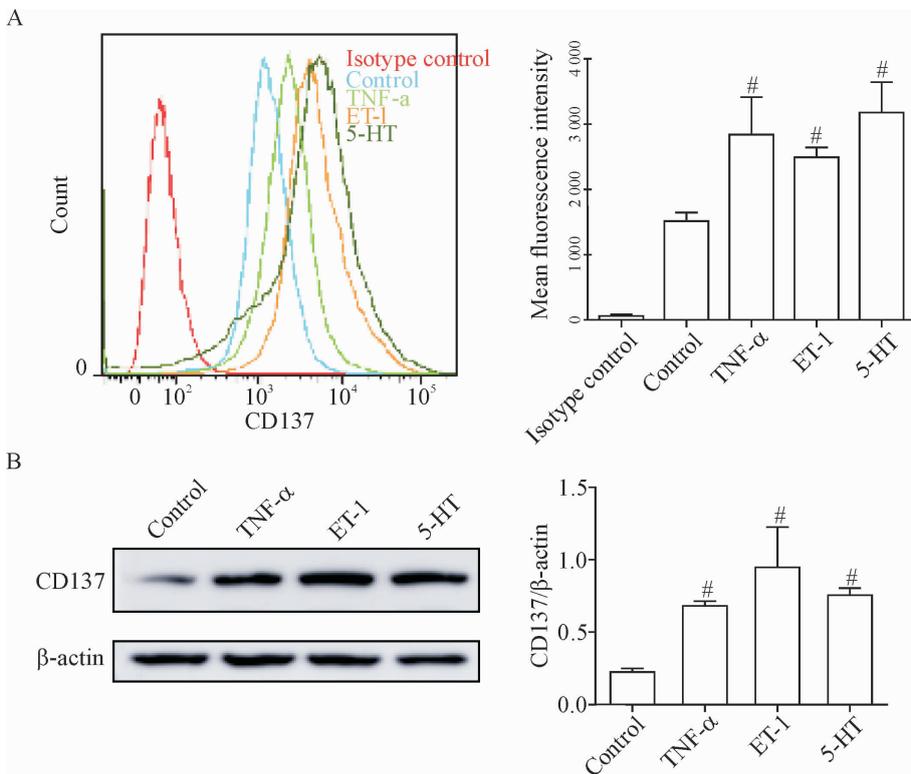


Figure 1. The expression of CD137 was increased in activated PAECs. The membrane CD137 (A) and total CD137 (B) were increased after stimulated with TNF- $\alpha$ , ET-1 and 5-HT. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . # $P < 0.05$  vs control group.

### 图 1 CD137 在活化的 PAECs 表达增加

### 2 激活 CD137 信号后, 小鼠 PAECs 有氧糖酵解水平增加

乳酸检测结果显示, CD137 激动剂组乳酸产量明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A。葡萄糖检测结果显示, CD137 激动剂组葡萄糖消耗明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。

糖酵解酶活性显示, CD137 激动剂组糖酵解酶 HK2 和 PFKFB3 酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2C。Western blot 结果显示, CD137 激动剂组糖酵解酶 HK2 和 PFKFB3 蛋白表达水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2D。

### 3 CD137 信号通过 c-Myc 调控有氧糖酵解

c-Myc 与细胞代谢改变和细胞增殖有着明确联系。Western blot 结果显示, CD137 激动剂组 c-Myc 蛋白表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A。预孵 c-Myc 特异性抑制剂 10074-G5 后, 糖酵解酶 HK2 和 PFKFB3 酶活性较 CD137 激动剂组显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。预孵 c-Myc 特异性抑制剂 10074-G5 后, 糖酵解酶 HK2 和 PFKFB3 蛋白表达水平明显低于 CD137 激动剂组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3C。DMSO 组 HK2 和 PFKFB3 酶活性及蛋白表达水平与 CD137 激动剂组相比差异均无统计学意义。

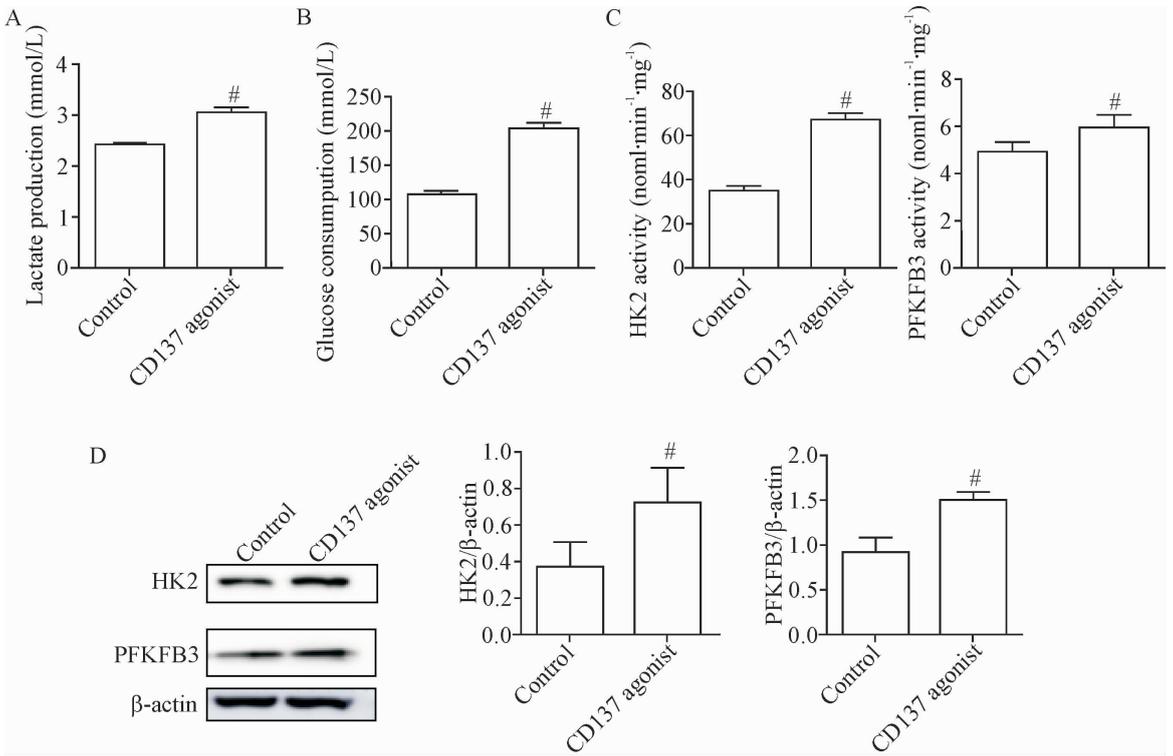


Figure 2. The aerobic glycolysis level was up-regulated in mouse PAECs after activation of CD137 signaling. A; lactate production; B; glucose consumption; C: the enzyme activity of HK2 and PFKFB3; D: the protein expression of HK2 and PFKFB3. Mean ± SD. *n* = 3. <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs control group.

图2 激活 CD137 信号后,小鼠 PAECs 有氧糖酵解水平增加

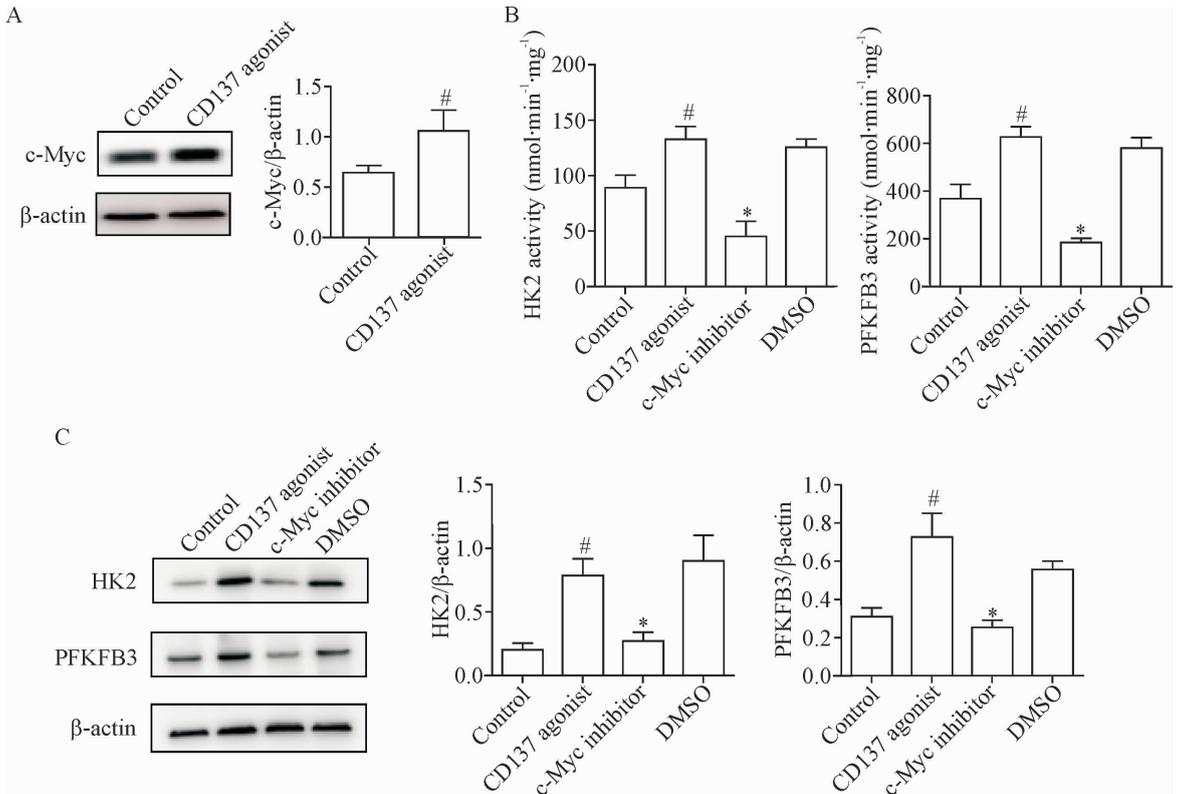


Figure 3. CD137 signaling regulated aerobic glycolysis by up-regulation of c-Myc. A; the expression of c-Myc; B; the enzyme activity of HK2 and PFKFB3; C: the protein expression of HK2 and PFKFB3. Mean ± SD. *n* = 3. <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs control group; <sup>\*</sup>*P* < 0.05 vs CD137 agonist group.

图3 CD137 信号通过 c-Myc 调控有氧糖酵解

#### 4 激活 CD137 信号促进 PAECs 增殖,抑制糖酵解后其促增殖作用被抑制

CCK-8 检测结果表明,CD137 激动剂组细胞 A 值显著高于对照组,但是加入糖酵解抑制剂 2-DG 后,CD137L 重组蛋白的促细胞增殖作用减弱,A 值明显下降( $P < 0.05$ ),见图 4A。

EdU 检测结果发现,CD137 激动剂组红色荧光明显强于对照组( $P < 0.05$ ),加入糖酵解抑制剂 2-DG 后红色荧光明显减少( $P < 0.05$ ),显著抑制了 CD137 信号的促增殖作用,见图 4B。以上结果表明,激活 CD137 信号会促进 PAECs 增殖,而 2-DG 可抑制 CD137 信号的促细胞增殖作用。

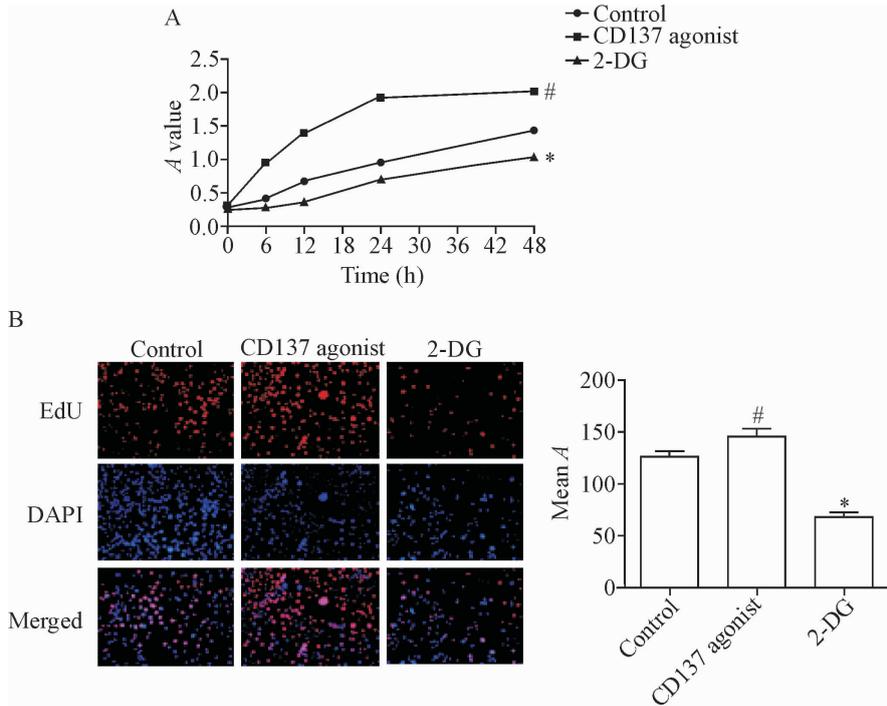


Figure 4. The activation of CD137 signaling promoted the proliferation of the PAECs, whereas glycolysis inhibitor 2-DG blocked the proliferation-enhancing effect of CD137 signaling. A: CCK-8 assay for cell viability; B: EdU staining for proliferation ( $\times 200$ ). Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . # $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs CD137 agonist group.

图 4 CD137 信号激活促进 PAECs 增殖,抑制糖酵解后促增殖作用被抑制

## 讨 论

PH 是一种发病机制十分复杂的疾病,目前病因尚未完全了解。研究显示,肺动脉内皮细胞损伤,内皮功能障碍是 PH 的重要启动因素<sup>[2]</sup>。PAECs 是肺血管内层的单层扁平细胞,分泌多种血管活性物质,维持血管正常的功能。缺氧、炎症、血流剪切力以及遗传因素都能引起肺血管内皮细胞损伤,最终导致其功能障碍<sup>[10]</sup>。损伤的内皮细胞发生凋亡,并且以旁分泌方式向周围分泌介质,诱导周围 PAECs 发生表型转变,形成过度增殖和凋亡耐受表型,最终形成特征性的“丛状损伤”,引起肺小血管闭塞重塑,导致严重的 PH<sup>[11]</sup>。研究表明,即使在氧气供应充足的情况下,PAECs 的能量来源主要依赖于有氧糖酵解;而当 PAECs 受损发生类肿瘤样增殖时,其有氧糖酵解反应大大增强<sup>[4]</sup>。因此,寻找及干预 PAECs 异常糖代谢的触发因素,是治疗肺高压的一个潜在新靶点。

炎症共刺激分子 CD137 是肿瘤坏死因子超家族成员,细胞表面 CD137 与其配体 CD137L 或活化型 CD137 单抗结合,激活 CD137 信号通路,通过复杂的调控机制,诱导内皮细胞功能紊乱,并且以 CD137 信号通路为靶点的人源化单抗已进入临床试验阶段<sup>[7]</sup>。正常的内皮细胞几乎不表达 CD137,本研究发现未活化的小鼠 PAECs 表达较低的 CD137 蛋白,而刺激因子 TNF- $\alpha$ 、ET-1 和 5-HT 刺激后 CD137 表达明显上调。因此,我们选择炎症因子 TNF- $\alpha$  诱导 PAECs 的 CD137 表达后,加入 CD137L 重组蛋白激活 CD137 信号,观察 PAECs 功能变化。

我们前期研究证实,激活的 CD137 信号通路能通过 Smad1/5-NFATc1 信号促进小鼠脑动脉内皮细胞增殖迁移<sup>[12]</sup>。本研究中激活 CD137 信号后,PAECs 葡萄糖消耗增加,细胞外乳酸水平升高,有氧糖酵解酶 HK2 和 PFKFB3 酶活性和蛋白水平平均明显增加,提示激活 CD137 信号通路能促进 PAECs 的有

氧糖酵解。同时细胞增殖实验显示,激活的 CD137 信号能促进 PAECs 增殖,而有氧糖酵解抑制剂 2-DG 能抑制 CD137 信号的促增殖作用。因此,本研究在体外证实,激活 CD137 信号通路能上调 PAECs 有氧糖酵解水平,进而促进细胞增殖。Choi 等<sup>[9]</sup>发现,激活的 CD137 信号通路可促进活化 CD8<sup>+</sup>T 细胞的糖酵解及脂肪酸代谢,促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖,抑制其凋亡。CD137 信号是否也影响 PAECs 的脂酸代谢有待进一步研究。

原癌蛋白 c-Myc 是 *myc* 基因家族的重要成员之一,其在细胞周期、细胞增殖及凋亡和细胞代谢过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。研究表明,c-Myc 可通过直接增强糖酵解酶基因转录或通过核蛋白剪接因子的受控表达促进 RNA 剪接,增强肿瘤细胞的有氧糖酵解<sup>[14]</sup>。本研究表明,激活 CD137 信号通路可上调 PAECs 的 c-Myc 蛋白表达。为进一步验证 c-Myc 参与 CD137 信号的促糖酵解作用,我们采用 c-Myc 抑制剂 10074-G5 沉默 c-Myc。实验结果表明,预孵 10074-G5 再激活 CD137 信号,有氧糖酵解关键酶 PFKFB3 和 HK2 的酶活性及蛋白水平均显著下降,提示 c-Myc 参与 CD137 信号的促糖酵解作用。因此,本研究在体外实验中证实 CD137 信号可能通过上调 c-Myc 表达,促进 PAECs 有氧糖酵解。然而 CD137 信号如何上调 PAECs 的 c-Myc 表达则需要进一步研究。

综上所述,本研究表明活化的 PAECs 中 CD137 信号分子表达增加;激活 CD137 信号能上调 c-Myc 蛋白水平,增强细胞有氧糖酵解,从而促进 PAECs 增殖。

[参 考 文 献]

[1] 朱迪颖,王 畅,付乃洁,等. 黄芩素对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠血管壁增厚的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5):899-903.

[2] 蒋晓敏,周 陵,陈绍良. 肺动脉高压肺血管丛状病变的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1519-1522.

[3] Chung WJ, Park YB, Jeon CH, et al. Baseline characteristics of the Korean registry of pulmonary arterial hypertension[J]. Korean Med Sci, 2015, 30(10):1429-1438.

[4] Zhao L, Ashek A, Wang L, et al. Heterogeneity in lung <sup>18</sup>FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic <sup>18</sup>FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments[J]. Circulation, 2013, 128(11):1214-1224.

[5] Peng H, Xiao Y, Deng X, et al. The Warburg effect; a new story in pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Chim Acta, 2016, 461:53-58.

[6] Zhong W, Li B, Li XY, et al. Amelioration of inflammatory cytokines mix stimulation; a pretreatment of CD137 signaling study on VSMC[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:1382805.

[7] Segal NH, Logan TF, Hodi FS, et al. Results from an integrated safety analysis of Urelumab, an agonist anti-CD137 monoclonal antibody[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(8):1929-1936.

[8] Olofsson PS, Söderström LA, Wågsäter D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice[J]. Circulation, 2008, 117(10):1292-1301.

[9] Choi BK, Lee DY, Lee DG, et al. 4-1BB signaling activates glucose and fatty acid metabolism to enhance CD8 T cell proliferation[J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(9): 748-757.

[10] Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, et al. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure[J]. Eur Respir J, 2012, 40(6):1555-1565.

[11] Machado RD. The molecular genetics and cellular mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension [J]. Scientifica (Cairo), 2012, 2012:106576.

[12] Weng JY, Wang CP, Zhong W, et al. Activation of CD137 signaling promotes angiogenesis in atherosclerosis via modulating endothelial Smad1/5-NFATc1 pathway[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(3):e004756.

[13] 龙梓洁,方志刚,潘晓娜,等. c-Myc 抑制剂 10058-F4 对伊马替尼耐药细胞的增殖抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(9):1590-1594.

[14] Osthus RC, Shim H, Kim S, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc [J]. J Biol Chem, 2000, 275(29):21797-21800.

(责任编辑:卢 萍,罗 森)