

[文章编号] 1007-3949(2017)25-01-0007-06

· 实验研究 ·

CD137-CD137L 信号通过 TRAF6/JNK/AP-1 通路调控小鼠 血管平滑肌细胞活化 T 细胞核因子 c1 表达

徐源, 王中群, 仲威, 邵晨, 李波, 刘俊, 李晓阳, 严金川

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] CD137-CD137L 信号; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; c-Jun 氨基末端激酶; 活化蛋白 1; 活化 T 细胞核因子 c1; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨 CD137-CD137L 信号是否通过肿瘤坏死因子受体相关因子 6/c-Jun 氨基末端激酶/活化蛋白 1(TRAF6/JNK/AP-1)途径调控小鼠血管平滑肌细胞(VSMC)活化 T 细胞核因子 c1(NFATc1)的表达。方法 采用组织块原代培养小鼠 VSMC, 第 3~5 代细胞用于实验。VSMC 分为 6 组: 对照组、CD137 刺激组、CD137 抑制组、siTRAF6 干预组、siJNK 干预组、siAP-1 干预组。Western blot 检测各组 TRAF6、磷酸化 JNK(p-JNK)、磷酸化 AP-1(p-AP-1)、NFATc1 蛋白表达水平。免疫荧光法检测各组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光表达。结果 (1) 与对照组相比, CD137 刺激组(CD137-CD137L 信号激活)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$) ; 与 CD137 刺激组相比, CD137 抑制组(CD137-CD137L 信号抑制)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。 (2) 采用 siRNA 技术分别沉默 TRAF6、JNK、AP-1 后, 与 CD137 刺激组相比, siTRAF6 干预组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达明显减少($P < 0.05$) ; siJNK 干预组 TRAF6 表达无改变, 而 p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达明显减少($P < 0.05$) ; siAP-1 干预组 TRAF6、p-JNK 表达无明显改变, 而 p-AP-1、NFATc1 表达明显减少($P < 0.05$)。 (3) 免疫荧光检测显示: CD137 刺激组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光表达量升高($P < 0.05$) ; CD137 抑制组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光表达量明显降低($P < 0.05$) ; siTRAF6 干预组、siJNK 干预组、siAP-1 干预组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光表达量与上述蛋白表达结果一致。结论 CD137-CD137L 信号可通过 TRAF6/JNK/AP-1 通路影响 NFATc1 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

CD137-CD137L signal regulates the expression of nuclear factor of activated T cell c1 in mouse vascular smooth muscle cells via TRAF6/JNK/AP-1 pathway

XU Yuan, WANG Zhong-Qun, ZHONG Wei, SHAO Chen, LI Bo, LIU Jun, LI Xiao-Yang, YAN Jin-Chuan

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] CD137-CD137L signal; Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6; c-Jun amino-terminal kinase; Activated protein-1; Nuclear factor of activated T cell c1; Vascular smooth muscle cell

[ABSTRACT] Aim To investigate whether CD137-CD137L signal through tumor necrosis factor receptor-associated factor-6/c-Jun amino-terminal kinase/activated protein-1 (TRAF6/JNK/AP-1) pathway to regulate the expression of nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) in mouse vascular smooth muscle cell (VSMC). Methods Mouse primary VSMCs were cultured from aortic tissue block, and third to fifth generations of cells were used for the experiment. VSMCs were divided into 6 groups: control group, CD137 stimulation group, CD137 inhibition group, siTRAF6 intervention group, siJNK intervention group and siAP-1 intervention group. The expression levels of TRAF6, phosphorylated JNK (p-JNK), phosphorylated AP-1 (p-AP-1) and NFATc1 protein were detected by Western blot in each group. The fluorescence expression of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were detected by immunofluorescence assay in each group. Results (1) Compared with control group, the expression levels of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 pro-

[收稿日期] 2016-08-05

[修回日期] 2016-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金(81170279、81370409); 江苏省自然科学基金(BK20161355); 六大人才高峰项目(WS074)

[作者简介] 徐源, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 991537896@qq.com。通讯作者严金川, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。

tein were significantly increased in CD137 stimulation group (CD137-CD137L signal activation) ($P < 0.05$). Compared with CD137 stimulation group, the expression levels of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 protein were significantly decreased in CD137 inhibition group (CD137-CD137L signal inhibition) ($P < 0.05$). (2) The siRNA technology was used to silence TRAF6, JNK and AP-1 respectively. Compared with CD137 stimulation group, the expressions of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were significantly reduced in siTRAF6 intervention group ($P < 0.05$) ; The expression of TRAF6 had no change, while the expression of p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were significantly decreased in siJNK intervention group ($P < 0.05$) ; The expressions of TRAF6 and p-JNK had no significant change, while the expressions of p-AP-1 and NFATc1 were significantly decreased in siAP-1 intervention group ($P < 0.05$). (3) Immunofluorescence assay showed that the fluorescent expressions of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were increased in CD137 stimulation group ($P < 0.05$), and the fluorescent expressions of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were significantly decreased in CD137 inhibition group ($P < 0.05$). The fluorescent expressions of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 were consistent with the above protein expressions in siTRAF6 intervention group, siJNK intervention group and siAP-1 intervention group.

Conclusion CD137-CD137L signal can affect the expression of NFATc1 through the TRAF6/JNK/AP-1 pathway.

活化 T 细胞核因子 c1(nuclear factor of activated T cell c1, NFATc1) 参与调控动脉粥样斑块的形成, 抑制 NFATc1 活性能明显抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖,从而阻遏粥样斑块的形成^[1-2]。我们前期研究^[3-4]证实:炎症共刺激分子 CD137-CD137L 相互作用可以调控 NFATc1 的表达从而影响斑块的形成, NFATc1 是连接 CD137-CD137L 信号与动脉粥样硬化斑块形成之间的关键分子。新近我们在小鼠平滑肌细胞实验中进一步发现:CD137-CD137L 信号能够通过肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, TRAF6)/核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB)通路调控 NFATc1 的表达^[5-6]。众所周知,TRAF6 是一个泛素连接酶,是炎症共刺激分子的下游分子,当它被上游分子激活时,会在自身和其他蛋白上产生短小蛋白链。因此 TRAF6 作为一个分子开关,能够决定在细胞内激活或开启何种信号通路;TRAF6 是一种重要的细胞内多功能信号分子,与炎症、骨代谢及动脉粥样硬化形成密切相关。TRAF6 是激活 NF-κB 通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的交叉点^[7],然而 CD137-CD137L 轴是否在激活 TRAF6/NF-κB 信号通路的同时也触发了 MAPK 家族 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)信号,最终诱导活化蛋白 1(activated protein-1, AP-1)的活化,从而进一步调控 NFATc1 的表达?因此,本研究旨在探讨炎症共刺激分子 CD137-CD137L 信号是否可通过 TRAF6/JNK/AP-1 信号通路调控 NFATc1 的表达。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

激动型 CD137 抗体购自美国 R&D 公司。拮抗型小鼠 CD137(4-1BB)抗体、IgG 同型对照购自美国 eBioscience 公司。TRAF6 抗体和磷酸化 AP-1 抗体购自美国 Advanced Bionics 公司。磷酸化 JNK 抗体、NFATc1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自碧云天生物科技有限公司。肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)购自美国 Peprotech 公司。TR-Izol 试剂购自美国 Inventrogen 公司。

1.2 细胞培养及分组

组织块贴壁法原代培养 C57BL/6J 小鼠胸主动脉 VSMC, 第 3~5 代细胞进行实验。实验分为 6 组:(1)对照组:用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,加入 TNF-α、白细胞介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)、干扰素 γ(interferon-γ, IFN-γ)(终浓度均为 10 μg/L);(2)CD137 刺激组:对照组基础上加激动型 CD137mAb(终浓度 7.5 mg/L);(3)CD137 抑制组:对照组基础上用激动型 CD137mAb(终浓度 7.5 mg/L)刺激 2 h 后,再加入拮抗型 CD137mAb(终浓度 10 mg/L);(4)siTRAF6 干预组:CD137 刺激组基础上加 siTRAF6(终浓度 16.7 nmol/L) 干预;(5)siJNK 干预组:CD137 刺激组基础上加 siJNK(终浓度 16.7 nmol/L) 干预;(6)siAP-1 干预组:CD137 刺激组基础上加 siAP-1(终浓度 16.7 nmol/L) 干预。

1.3 Western blot 检测

提取各实验组细胞蛋白,按其不同浓度制备成蛋白含量相等的实验样品,并煮沸变性,低温冷藏备用。上样、电泳、转膜、封闭后,分别加入 TRAF6(1:1000)、磷酸化 JNK(p-JNK)(1:2000)、磷酸

化 AP-1(p-AP-1)(1:2000)、NFATc1(1:300)、GAPDH(1:1500)一抗,4℃孵育过夜,TBST洗涤3次后室温下孵育二抗(1:1000)2 h,加高灵敏发光液,置于发光系统观察待测蛋白条带的灰度差异,以内参为参照,用内参与灰度值的比值表示蛋白表达水平。

1.4 免疫荧光法检测各组细胞中 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光表达

将处于对数生长期的 VSMC 接种 24 孔板中,待细胞完全贴壁后,分别予以不同的培养体系,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中共孵育 24 h。多聚甲醛固定细胞,0.3%Triton X-100 作用 40 min 后,3%牛血清白蛋白封闭,分别加入 TRAF6(1:1000)、p-JNK(1:2000)、p-AP-1(1:2000)、NFATc1(1:300)一抗,4℃孵育过夜。二抗(1:1000)室温孵育 1 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染核。置于荧光显微镜观察,采集图像。

1.5 CCK-8 法检测各实验组细胞 0、12、24、48 h 增殖情况

将处于对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化,以培养液稀释细胞使其浓度为(1~5)×10⁷/L,分别取 100 μL 至 96 孔培养板,每组细胞每块板接种 3 个同样的孔作为复孔,细胞数为 3×10³ 个/孔,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养过夜;每块板设置 3 个组:对照组、CD137 刺激组、CD137 抑制组;分别在给药 0、12、24、48 h 后,按 1:10 体积比混合 Cell Counting Kit-8(CCK-8)和无血清必需基本培养基,每孔 100 μL 加入待测孔中,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 1 h;用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(absorbance,A)值。记录每块板的数值。

1.6 统计学方法

本实验统计软件采用 SPSS 17.0 软件,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及小样本 t 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD137-CD137L 信号变化影响 VSMC 增殖

各组细胞干预结束后,分别在 0、12、24、48 h 监测每组吸光度值(A 值)后绘制生长曲线。结果显示:CD137 刺激组细胞生长率较对照组显著增高(1.06 ± 0.12 比 0.78 ± 0.06 , $P < 0.05$),而 CD137 抑制组细胞生长率较 CD137 刺激组显著下降(0.89 ± 0.05 比 1.06 ± 0.12 , $P < 0.05$;图 1)。

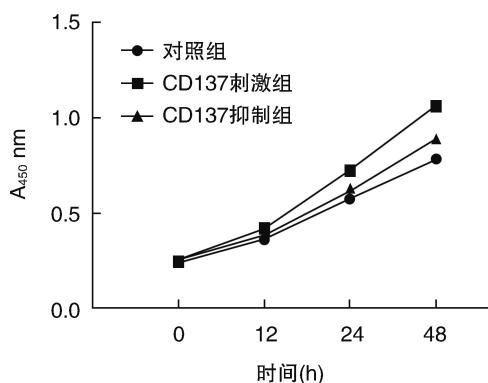


图 1. CD137-CD137L 信号变化可以调控 VSMC 的增殖

Figure 1. CD137-CD137L signal change may regulate the proliferation of VSMC

2.2 CD137-CD137L 信号对 VSMC 中 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达的影响

采用 Western blot 检测方法发现,与对照组相比,CD137 刺激组(CD137-CD137L 信号激活)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达增多;与 CD137 刺激组相比,CD137 抑制组(CD137-CD137L 信号抑制)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达降低。采用 siRNA 技术分别沉默 TRAF6、JNK、AP-1 后,与 CD137 刺激组相比,siTRAF6 干预组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达降低;siJNK 干预组 TRAF6 表达无明显改变,而 p-JNK、p-AP-1、NFATc1 表达降低;siAP-1 干预组 TRAF6、p-JNK 表达无明显改变,而 p-AP-1、NFATc1 表达下降(图 2、表 1)。

2.3 CD137-CD137L 信号对 VSMC 中 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 荧光强度的影响

免疫荧光检测发现,与对照组相比,CD137 刺激组(CD137-CD137L 信号激活)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 阳性荧光值明显增多($P < 0.05$);与 CD137 刺激组相比,CD137 抑制组(CD137-CD137L 信号抑制)TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 阳性荧光值明显降低($P < 0.05$)。采用 siRNA 技术分别沉默 TRAF6、JNK、AP-1 后,与 CD137 刺激组相比,siTRAF6 干预组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 阳性荧光值明显减少($P < 0.05$);siJNK 干预组 TRAF6 阳性荧光值无明显改变,而 p-JNK、p-AP-1、NFATc1 阳性荧光值明显减少($P < 0.05$);siAP-1 干预组 TRAF6、p-JNK 阳性荧光值无明显改变,而 p-AP-1、NFATc1 阳性荧光值明显减少($P < 0.05$)(图 3、图 4)。

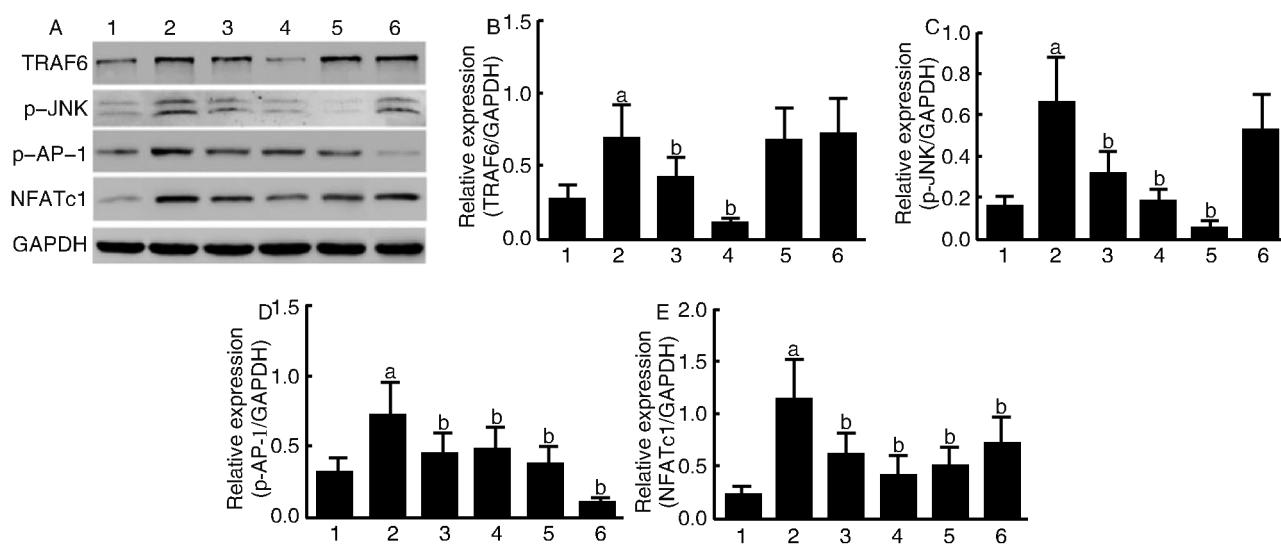


图2. 各组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 蛋白表达 (n=3) A为蛋白印迹图,B、C、D、E为TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1相对吸光度值的半定量分析。1为对照组,2为CD137刺激组,3为CD137抑制组,4为siTRAF6干预组,5为siJNK干预组,6为siAP-1干预组。a为P<0.05,与对照组比较;b为P<0.05,与CD137刺激组比较。

Figure 2. Protein expression of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 in each experimental group (n=3)

表1. 各组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 相对吸光度值的半定量分析 (n=3)

Table 1. Semiquantitative analysis of the relative expression about TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 in each experimental group (n=3)

指标	CD137 刺激组	CD137 抑制组	siTRAF6 干预组	siJNK 干预组	siAP-1 干预组
TRAF6	1.60±0.26	0.60±0.08 ^a	0.17±0.02 ^a	1.05±0.12	0.98±0.09
p-JNK	1.76±0.21	0.47±0.06 ^a	0.30±0.05 ^a	0.05±0.01 ^a	1.12±0.15
p-AP-1	1.57±0.31	0.62±0.06 ^a	0.31±0.04 ^a	0.45±0.02 ^a	0.16±0.04 ^a
NFATc1	1.80±0.36	0.54±0.15 ^a	0.32±0.05 ^a	0.50±0.06 ^a	0.64±0.05 ^a

a为P<0.05,与CD137刺激组比较。

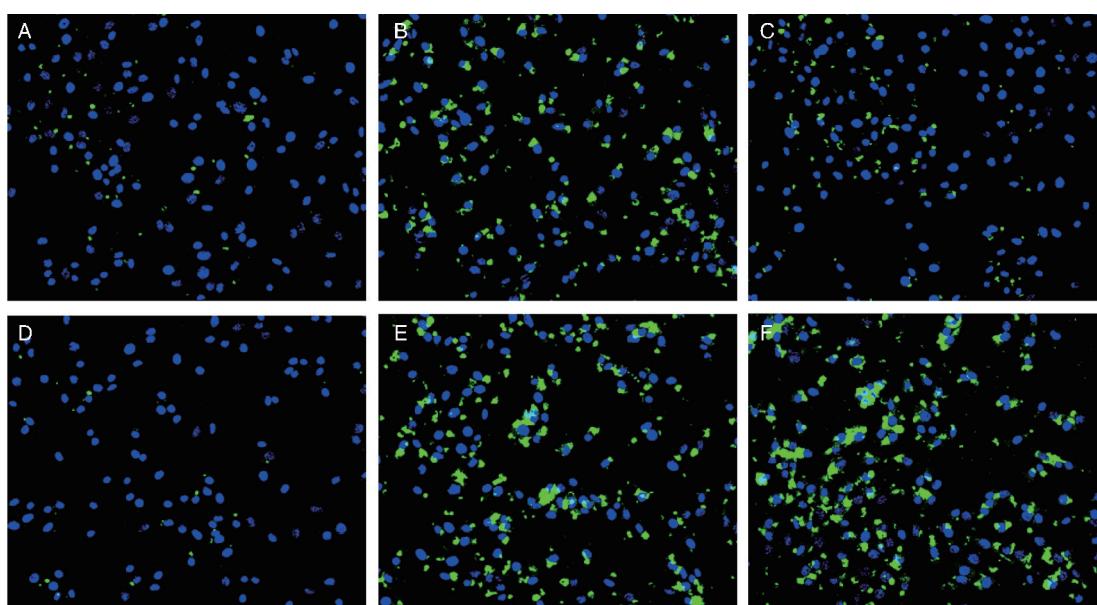


图3. 免疫荧光法检测 TRAF6 在 VSMC 中的表达 (200×) A为对照组,B为CD137刺激组,C为CD137抑制组,D为siTRAF6干预组,E为siJNK干预组,F为siAP-1干预组。绿色荧光为TRAF6染色阳性区,蓝色荧光为DAPI细胞核染色。

Figure 3. Expression of TRAF6 detected by immunofluorescence method in VSMC (200×)

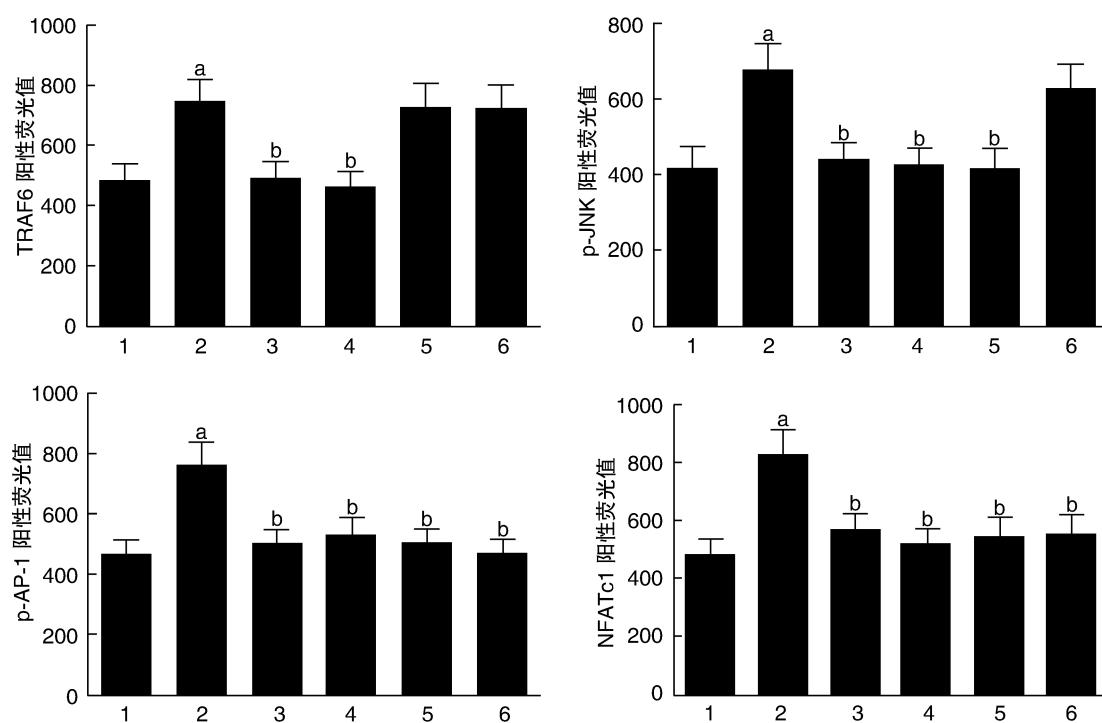


图4. 各组 TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1 阳性荧光表达 ($n=3$) 1为对照组,2为CD137刺激组,3为CD137抑制组,4为 siTRAF6干预组,5为siJNK干预组,6为siAP-1干预组。a为 $P<0.05$,与对照组比较;b为 $P<0.05$,与CD137刺激组比较。

Figure 4. Fluorescence expression of TRAF6, p-JNK, p-AP-1 and NFATc1 in each experimental group ($n=3$)

3 讨 论

CD137信号分子属于TNF受体超家族的成员,其信号的激活和抑制在炎症、免疫等相关疾病的调节过程中起重要的作用^[8-9]。新近研究表明,CD137与其配体CD137L相互作用在动脉粥样硬化斑块发生过程中起重要作用^[10-11]。我们前期研究^[5]显示,激活CD137-CD137L信号能够促进ApoE^{-/-}小鼠斑块的形成,诱导斑块中淋巴细胞的激活和增殖,并促使NFATc1表达增加,证实NFATc1是CD137-CD137L信号通路的下游分子。Aliprantis等^[12]研究发现,CD137-CD137L信号能够通过TRAF6/NF- κ B通路调控细胞NFATc1的表达,NFATc1是细胞内重要的转录因子,参与细胞增殖、炎症因子释放等。

TRAF6是细胞内多功能的信号转导分子,与炎症刺激及动脉粥样硬化斑块形成密切相关。TRAF6是激活NF- κ B通路和MAPK信号通路的交叉点,在与动脉粥样硬化血管钙化有相似机制的骨形成过程中发现,炎症共刺激分子调控NFATc1表达需激活TRAF6信号,TRAF6被激活后既可以通过TRAF6/NF- κ B通路调控NFATc1表达,也可以通过MAPK信号(TRAF6/JNK/AP-1途径)调控转录因

子NFATc1。然而,CD137-CD137L信号调控NFATc1的表达是否在激活TRAF6/NF- κ B信号的同时也触发了TRAF6/JNK/AP-1途径?目前尚不清楚。

本实验在细胞水平探讨了CD137-CD137L信号是否通过TRAF6/JNK/AP-1途径调控小鼠VSMC的NFATc1表达,正常VSMC很少表达CD137分子,通过加入炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ)预刺激诱导VSMC表达CD137,再予CD137激动型抗体激活CD137-CD137L信号,结果显示:VSMC的TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1荧光及蛋白表达水平均明显增加,抑制CD137-CD137L信号时TRAF6、p-JNK、p-AP-1、NFATc1荧光及蛋白表达水平降低。进一步通过siRNA干扰技术分别沉默TRAF6、p-JNK、p-AP-1时,CD137-CD137L信号调控NFATc1的表达均明显受到抑制,并且显示出信号通路中自上而下的逐级抑制效应。提示CD137-CD137L信号能够激活TRAF6/JNK/AP-1通路进而调控NFATc1的表达。

综上所述,本研究显示CD137-CD137L信号可通过TRAF6/JNK/AP-1通路影响NFATc1的表达,刺激CD137-CD137L信号无论是激活TRAF6/NF- κ B通路或是TRAF6/JNK/AP-1途径均显示其在动

脉粥样硬化斑块形成中的重要作用,然而 CD137-CD137L 如何将信号传递至 TRAF6 以及是否存在其他信号通路有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Sieber M, Baumgrass R. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub-alternatives to CsA and FK506? [J]. *Cell Commun Signal*, 2009, 7(1): 1-19.
- [2] Karpurapu M, Wang D, Singh NK, et al. NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis[J]. *Biol Chem*, 2008, 283 (39): 26 577-590.
- [3] Yan J, Yang H, Yuan W, et al. The effect of CD137-CD137 ligand interaction on the expression of NFATc1 in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 157(1): 134-137.
- [4] 刘阳, 严金川, 仲威, 等. microRNA-124-2 在 CD137-CD137L 信号通路调控小鼠血管平滑肌细胞活化 T 细胞核因子 C1 表达中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 13-17.
- [5] 殷云杰, 严金川, 王中群, 等. CD137 信号通过核因子 κB 影响小鼠主动脉平滑肌细胞活化 T 细胞核因子 c1 表达[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(7): 614-618.
- [6] Yan J, Yin Y, Zhong W, et al. CD137 regulates NFATc1 expression in mouse VSMCS through TRAF6/NF-κB p65 signaling pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 1-10.
- [7] Jeong S, Cho IR, An WG, et al. STP-A11, an oncoprotein of herpesvirus saimiri augments both NF-kappa B and AP-1 transcription activity through TRAF6[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(1): 56-64.
- [8] Hansson GK. Atherosclerosis—an immune disease: the Anitschkov lecture 2007[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1): 2-10.
- [9] Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy [J]. *BMB Rep*, 2014, 47(3): 122-129.
- [10] Olofsson PS, Soderstrom LA, Wagsater D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice[J]. *Circulation*, 2008, 117(10): 1 292-301.
- [11] Jeon HJ, Choi JH, Jung IH, et al. CD137(4-1BB) deficiency reduces atherosclerosis in hyperlipidemic mice[J]. *Circulation*, 2010, 121(9): 1 124-133.
- [12] Aliprantis AO, Glimcher LH. NFATc1 in inflammatory and musculoskeletal conditions [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 658(658): 69-75.

(此文编辑 曾学清)