

酰基甘油激酶通过影响PTEN/PI3K/Akt/Gsk3 β 信号通路调控血小板活化

张鹏 毕昌龙 魏萌 姜哲轶 张田田 张俊峰

【摘要】 目的:探究酰基甘油激酶 (AGK) 在血小板活化中的作用及可能的调控机制。**方法:**分别提取野生型小鼠 (WT) 和 AgkG126E 点突变 (AGK 激酶活性丧失) 小鼠 (PM) 的血小板。将等体积、等浓度的 WT 或 PM 小鼠的血小板放入聚集仪, 分别利用 3 种刺激剂 (α -Thrombin、ADP、U46619) 刺激, 检测每种刺激剂作用下相应的血小板聚集水平; 每管聚集曲线达到最大稳定值后, 加入等体积的 ATP 荧光检测剂, 检测相应血小板活化过程中释放的 ATP 水平。分别在静息态 WT 或 PM 小鼠血小板 (不加 α -Thrombin 刺激)、活化态 WT 或 PM 小鼠血小板 (加入 α -Thrombin 刺激) 中加入等量荧光偶联的纤维蛋白原 (Fg), 利用流式细胞仪检测血小板的 Fg 结合水平。Western blot 法分别检测静息态 (不加刺激剂) 和活化态 (加入 α -Thrombin、ADP、U46619 刺激) WT 或 PM 小鼠血小板中关键信号通路蛋白的磷酸化水平。**结果:**在刺激剂作用于血小板后, PM 小鼠血小板的聚集程度、ATP 释放水平及 Fg 结合能力均明显低于 WT 小鼠的血小板 (P 均 <0.01)。与 WT 小鼠相比, PM 小鼠的血小板在活化过程中张力蛋白同源磷酸酶 (PTEN)、磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt-Thr308) 和糖原合成激酶 3 β (Gsk3 β -Ser9) 的磷酸化水平均明显降低 (P 均 <0.01)。**结论:**酰基甘油激酶可能通过影响 PTEN/PI3K/Akt/Gsk3 β 信号通路, 参与调控血小板的活化。

【关键词】 酰基甘油激酶; 血小板活化; 张力蛋白同源磷酸酶; 磷脂酰肌醇 3- 激酶; 蛋白激酶 B; 糖原合成激酶 3 β

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.01.012

Platelet activation is regulated by acylglycerol kinase via activating PTEN/PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway ZHANG Peng, BI Changlong, WEI Meng, JIANG Zheyi, ZHANG Tiantian, ZHANG Junfeng Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

【Abstract】 Objective: To explore the role and possible regulatory mechanism of acylglycerol kinase (AGK) during platelet activation. **Methods:** Platelets were extracted from wild-type mice (WT) and Agk G126E point mutant mice (deprivation of AGK activity), respectively. Levels of aggregation, ATP secretion and fibrinogen (Fg) binding during platelet activation were detected using platelet agonists, aggregator and flow cytometer. The phosphorylation levels of key signaling pathway proteins during platelet activation were assessed by western blot assays. **Results:** Upon stimulation with the agonists at same concentration, levels of aggregation, ATP secretion and Fg binding of platelets were significantly lower in Agk G126E mice than those in WT mice (all $P < 0.01$). Western blotting showed that, compared with WT mice, phosphorylation levels of phosphatase and tensin homolog (PTEN), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt-Thr308), glycogen synthase kinase 3 β (Gsk3 β -Ser9) were decreased during platelets activation in Agk G126E mice (all $P < 0.01$). **Conclusion:** This study suggests that AGK may regulate platelet activation through mediating PTEN/PI3K/Akt/GSK3 β

signaling pathway.

【Key words】 Acylglycerol kinase; Platelet activation; Phosphatase and tensin homolog; Phosphatidylinositol-3-kinase; Protein kinase B; Glycogen synthase kinase 3 β

以冠状动脉血栓与脑卒中为主的动脉血栓性疾病的患病率、致死率和致残率高,严重威胁人类健康^[1]。在动脉血栓的形成过程中,血小板活化处于中心环节^[2-3]。临床应用的抗血小板药均通过特异性阻断血小板活化过程发挥作用,因此,研究血小板活化调控机制对新型抗血小板药物的研发具有重要意义。

酰基甘油激酶 (AGK) 最早作为线粒体内膜蛋白被发现,具有重要的脂质激酶活性,能够催化酰基甘油磷酸化,生成磷脂酸^[4]。AGK 还有协助物质运输的功能,且该功能不依赖其激酶活性^[5]。近年来,AGK 被证实在多种实体肿瘤中高表达,在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用^[6-8]。Jiang 等^[9]发现 AGK 可以调控巨核细胞的分化和血小板的生成。本研究探讨 AGK 在血小板活化中的作用及可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 野生型小鼠 (WT) 12 只,8 周龄,由上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房进行 SPF 级标准饲养。雄性 Agk G126E 点突变小鼠 (PM) 12 只,8 周龄,该小鼠模型 AGK 126 位点从甘氨酸对应的密码子 GGC 突变为谷氨酸对应的密码子 GAA,使 AGK 的丧失脂质激酶功能。模型构建后采用 Sanger 测序确定 PM 小鼠点突变的基因型,Western blot 法检测 AGK 蛋白表达水平。该小鼠由上海交通大学基础医学院刘俊岭教授实验室赠予。

1.2 实验试剂与仪器

凝血酶 (α -Thrombin)、二磷酸腺苷 (ADP)、血栓素 A2 类似物 (U46619) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。三磷酸腺苷 (ATP) 释放的荧光检测剂 CHRONO-LUME 购自美国 CHRONO-LOG 公司。荧光素偶联纤维蛋白原 (Fg) 购自美国 Thermo Fisher 公司。抗磷酸化张力蛋白同源性磷酸酶 (PTEN) 抗体、抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抗体、抗磷酸化蛋白激酶 B (Akt-Thr308) 抗体、抗磷酸化糖原合成激酶 3 β (Gsk3 β -Ser9) 抗体、抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记二

抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。抗 AGK 抗体购自美国 Santa 公司。动物血球分析仪购自美国 HEMAVET 公司,血小板聚集仪购自美国 CHRONO-LOG 公司,流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 制备洗涤血小板

WT 和 PM 小鼠麻醉后经腹主动脉取血,动物血球分析仪检测每只小鼠的血小板数量,血液经 2 次离心获得血小板沉淀,再加入血小板平衡盐溶液将血小板吹匀,计数至 $3 \times 10^8/\text{mL}$,于 37 °C 水浴静息待用。

1.4 血小板聚集实验

血小板聚集仪预热至 37 °C,取 300 μL WT 或 PM 小鼠洗涤血小板加至血小板聚集管中,将聚集管放入血小板聚集仪的孔道并建立基线。待基线平稳后,分别向血小板聚集管中加入不同浓度的激动剂,包括 α -Thrombin、U46619、ADP,记录 5 min 内的血小板聚集曲线,每组进行 4 次独立重复实验。

1.5 血小板 ATP 释放实验

当 WT 或 PM 小鼠的血小板由 α -Thrombin、U46619 或 ADP 刺激产生的聚集曲线于 5 min 到达平台期时,加入 10 μL ATP 荧光检测剂 CHRONO-LUME,记录释放曲线 3 min,每组进行 4 次独立重复实验。

1.6 血小板 Fg 结合实验

分别设置静息组 (不加 α -Thrombin 刺激) WT 或 PM 小鼠血小板、活化组 (加 α -Thrombin 至终浓度 0.08 U/mL) WT 或 PM 小鼠血小板。用血小板平衡盐溶液将 WT 和 PM 小鼠的洗涤血小板稀释成 $6 \times 10^7/\text{mL}$,吸取 100 μL 稀释后的血小板,加入荧光素偶联的 Fg 2 μL ,轻轻混匀后,37 °C 避光孵育 30 min。加入 4% 甲醛固定液 400 μL ,避光混匀,用流式细胞仪分析。每组进行 8 次独立重复实验。

1.7 血小板活化通路蛋白磷酸化水平检测

收集静息组 (不加 α -Thrombin、U46619 或 ADP 刺激,未进行聚集实验) 及活化组 (经 α -Thrombin、U46619 或 ADP 刺激,完成聚集实验)

的血小板样品, SDS 缓冲液提取蛋白, 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转膜, 5% 牛奶封闭 1 h。抗 p-PTEN、p-PI3K、p-Akt-Thr308、p-Gsk3 β -Ser9 和 β -actin 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后室温孵育二抗 1 h。利用化学发光底物显色, ImageJ 软件进行灰度分析。目的蛋白磷酸化水平=磷酸化蛋白灰度值/总蛋白灰度值, 每组样品的检测结果重复 3 次。

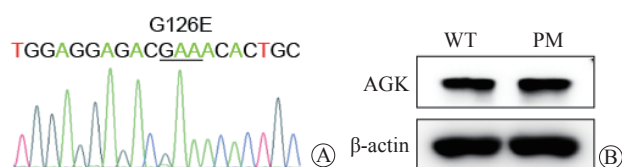
1.8 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均值 \pm 标准差表示, 数据呈正态分布且方差齐, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 PM小鼠构建

Sanger 测序基因型鉴定结果表明, PM 小鼠点突变构建成功; Western blot 法检测结果显示 Agk G126E 点突变不影响 AGK 蛋白的表达, 见图 1。WT 和 PM 小鼠的血小板计数无统计学差异 [$(0.94 \pm 0.03) \times 10^{12}/L$ 对 $(0.90 \pm 0.12) \times 10^{12}/L$, $P > 0.05$], Agk G126E 点突变未对血小板数量产生影响。



注: A为Sanger测序法鉴定PM小鼠基因型; B为Western blot法检测小鼠血小板AGK蛋白表达情况

图1 PM小鼠鉴定

2.2 3种刺激剂作用下WT和PM小鼠血小板的聚集程度

血小板聚集的检测结果表明, PM 小鼠的血小板在 α -Thrombin (0.08 U/mL)、ADP (25 μ mol/L) 和 U46619 (1.5 μ mol/L) 刺激下的聚集程度均明显低于 WT 小鼠 (P 均 < 0.01), 见图 2、表 1。

2.3 3种刺激剂作用下WT和PM小鼠血小板的ATP释放水平

血小板 ATP 释放的检测结果表明, PM 小鼠的血小板在 α -Thrombin (0.08 U/mL)、ADP (25 μ mol/L) 和 U46619 (1.5 μ mol/L) 刺激下的 ATP 释放水平均明显低于 WT 小鼠 (P 均 < 0.01), 见图 3、表 1。

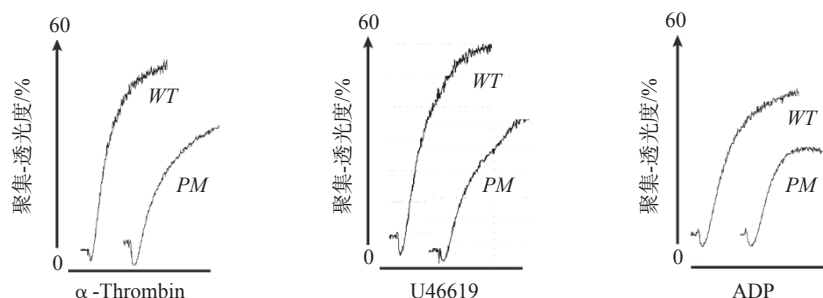


图2 3种刺激剂作用下血小板的聚集曲线

表1 活化血小板聚集和ATP释放水平比较

分组	聚集水平/%	ATP释放水平/%
α -Thrombin刺激WT血小板	58.25 ± 1.18	50.50 ± 3.07
α -Thrombin刺激PM血小板	$44.25 \pm 1.44^{(1)}$	$25.50 \pm 3.80^{(1)}$
U46619刺激WT血小板	65.00 ± 2.04	70.00 ± 3.85
U46619刺激PM血小板	$52.50 \pm 1.04^{(2)}$	$40.75 \pm 5.30^{(2)}$
ADP刺激WT血小板	49.25 ± 1.49	55.50 ± 4.94
ADP刺激PM血小板	$34.50 \pm 2.63^{(3)}$	$13.25 \pm 2.87^{(3)}$

注: 与 α -Thrombin刺激WT血小板相比, $^{(1)}P < 0.01$; 与U46619刺激WT血小板相比, $^{(2)}P < 0.01$; 与ADP刺激WT血小板相比, $^{(3)}P < 0.01$

2.4 α -Thrombin刺激下WT和PM小鼠血小板Fg结合能力

流式结果表明, 静息组 WT 和 PM 小鼠血小板 Fg 结合的流式曲线高峰位置相近, 平均荧光强度值相近。在 α -Thrombin (0.08 U/mL) 刺激后, 与 PM 小鼠相比, WT 小鼠的血小板 Fg 结合的流式曲线高峰明显右移, 平均荧光强度值明显降低 ($6\ 010.5 \pm 153.8$ 对 $4\ 336.0 \pm 135.6$, $P < 0.001$), 提示 PM 小鼠血小板 Fg 结合能力明显减弱。见图 4。

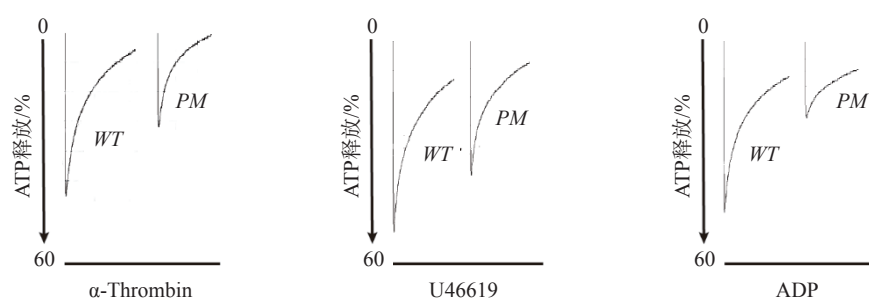


图3 3种刺激剂作用下血小板ATP的释放曲线

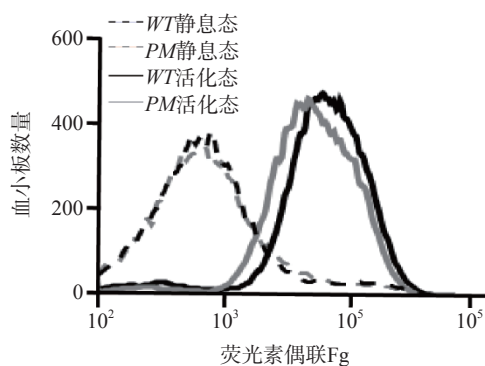


图4 血小板Fg结合的流式曲线

2.5 3种刺激剂作用下WT和PM小鼠血小板活化过程的通路蛋白磷酸化水平

Western blot 检测结果表明,与活化组血小板相比,静息组 WT 和 PM 小鼠血小板中的相应信号分子的磷酸化水平较低。见图 5。在同等刺激剂 α -Thrombin (0.08 U/mL)、ADP (25 mmol/L) 和 U46619 (1.5 μ mol/L) 刺激下,与 WT 小鼠相比,PM 小鼠血小板活化过程中 PTEN、PI3K、Akt-Thr308、Gsk3 β -Ser9 的磷酸化水平均有所降低 (P 均 <0.01),见图 5、表 2。

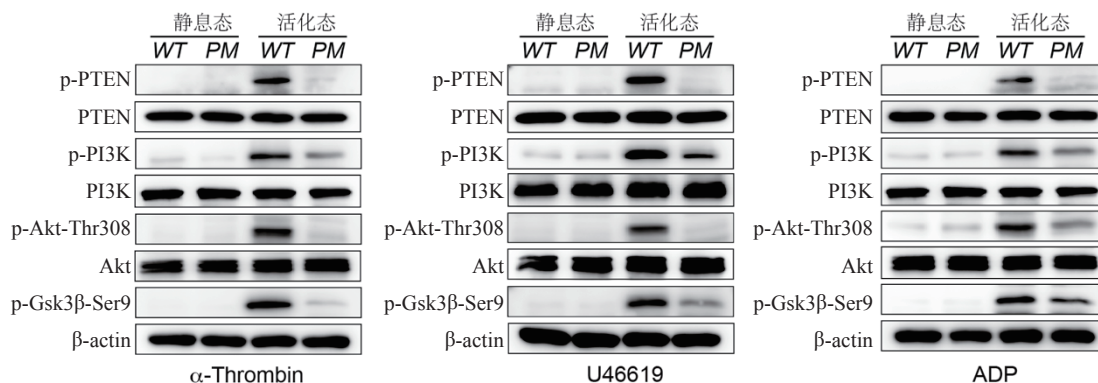


图5 血小板活化过程的通路蛋白磷酸化水平检测

表2 血小板活化过程的各组蛋白磷酸化水平比较

分组	p-PTEN	p-PI3K	p-Akt-Thr308	p-Gsk3 β -Ser9
α -Thrombin刺激WT血小板	0.75 \pm 0.05	0.69 \pm 0.07	0.68 \pm 0.06	0.74 \pm 0.04
α -Thrombin刺激PM血小板	0.16 \pm 0.01 ⁽¹⁾	0.21 \pm 0.11 ⁽¹⁾	0.15 \pm 0.05 ⁽¹⁾	0.14 \pm 0.01 ⁽¹⁾
U46619刺激WT血小板	0.74 \pm 0.06	0.76 \pm 0.05	0.62 \pm 0.05	0.65 \pm 0.06
U46619刺激PM血小板	0.15 \pm 0.06 ⁽²⁾	0.32 \pm 0.13 ⁽²⁾	0.16 \pm 0.04 ⁽²⁾	0.13 \pm 0.01 ⁽²⁾
ADP刺激WT血小板	0.49 \pm 0.02	0.57 \pm 0.03	0.59 \pm 0.03	0.53 \pm 0.04
ADP刺激PM血小板	0.19 \pm 0.02 ⁽³⁾	0.29 \pm 0.08 ⁽³⁾	0.25 \pm 0.12 ⁽³⁾	0.31 \pm 0.05 ⁽³⁾

注:与 α -Thrombin刺激WT血小板相比,⁽¹⁾ $P<0.01$;与U46619刺激WT血小板相比,⁽²⁾ $P<0.01$;与ADP刺激WT血小板相比,⁽³⁾ $P<0.01$

3 讨论

聚集是血小板活化的重要表现形式之一,也是止血和动脉血栓的基础。血小板的致密颗粒中含有大量的 ATP,当血小板活化时,ATP 会被释放至胞外^[2]。Fg 是血小板黏附受体 GP II b/ III a 的天然配体,在血小板静息时,二者的结合作用很弱;当血小板活化时,GP II b/ III a 胞外构象改变,对 Fg 的亲合力显著增强^[10]。因此,血小板聚集程度、ATP 释放水平及 Fg 结合能力是体外研究中评估血小板活化的经典指标。将 AGK 的第 126 位氨基酸 G (甘氨酸) 突变成 E (谷氨酸),可以剥夺其激酶活性^[4],但对 AGK 蛋白的表达没有影响^[5,11]。本研究发现,在同种刺激剂作用后,PM 小鼠的血小板聚集程度、ATP 释放水平和 Fg 结合能力均明显降低,提示 AGK 激酶活性缺失会导致血小板活化水平明显受损。

Wang 等^[8]研究表明 AGK 可以激活 PI3K/AKT 信号通路,调节乳腺癌的细胞周期。Zhu 等^[6]研究发现,AGK 可以激活 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路,促进肾癌的进展、转移。这些研究提示 AGK 过表达水平与关键信号分子的磷酸化水平呈正相关。Hu 等^[12]发现 AGK 可以磷酸化 PTEN,使 PTEN 失活,从而活化 PI3K/AKT 信号通路,增强 CD8⁺ T 细胞的糖酵解能力。

PI3K 是高度保守的酶家族,可以在多种血小板受体下游被激活^[13-14],其转导的信号可以促进血小板黏附和聚集,通过活化 GP II b/ III a 和增强 Ca²⁺ 释放促进血栓形成^[15]。Akt 是 PI3K 激活的主要下游酶^[16],PI3K 能促进 Akt 的 308 位苏氨酸的磷酸化,在 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 介导的血小板活化中起关键作用^[17]。Gsk3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以阻断 GP II b/ III a 介导的“外-内”信号对血小板的聚集、铺展、栓块收缩和血栓稳定的作用,进而起负向调节作用,而 Akt 可以磷酸化 Gsk3 β 第 9 位丝氨酸,抑制其激酶活性^[18]。PTEN 是血小板 PI3K/Akt 信号的负向调节因子^[19-20],而 PTEN 的磷酸化会使其活性丧失。本研究通过 3 种 GPCR 激动剂刺激血小板活化,发现 PM 小鼠血小板活化信号通路中 PTEN、PI3K、Akt-Thr308 和 Gsk3 β -Ser9 的磷酸化水平均有所降低,提示 AGK 激酶活性的丧失影响了信号分子的磷酸化水平。

综上所述,本研究结果显示 AGK 可能通过影响 PTEN/PI3K/Akt/Gsk3 β 信号通路,参与调控血小

板的活化。血小板活化的信号转导过程错综复杂,AGK 是否存在其他调控机制,能否成为新的抗血小板药物研发靶点,尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159):1736-1788.
- [2] Estevez B, Du XP. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(2):162-177.
- [3] Yeung J, Li WJ, Holinstat M. Platelet signaling and disease: targeted therapy for thrombosis and other related diseases[J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(3):526-548.
- [4] Bektas M, Payne SG, Liu H, et al. A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells[J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(5):801-811.
- [5] Vukotic M, Nolte H, König T, et al. Acylglycerol kinase mutated in sengers syndrome is a subunit of the TIM22 protein translocase in mitochondria[J]. *Mol Cell*, 2017, 67(3):471-483.
- [6] Zhu Q, Zhong AL, Hu H, et al. Acylglycerol kinase promotes tumour growth and metastasis via activating the PI3K/AKT/GSK3 β signalling pathway in renal cell carcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):2.
- [7] Zhao Q, Sun P, Qin SB, et al. Acylglycerol kinase promotes the stemness of nasopharyngeal carcinoma cells by promoting β -catenin translocation to the nucleus through activating PI3K/Akt pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(12):1299-1307.
- [8] Wang X, Lin CY, Zhao XH, et al. Acylglycerol kinase promotes cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:106.
- [9] Jiang HJ, Yu Z, Ding N, et al. The role of AGK in thrombocytopoiesis and possible therapeutic strategies[J]. *Blood*, 2020, 136(1):119-129.
- [10] Huang JS, Li X, Shi XF, et al. Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):26.
- [11] Kang YL, Stroud DA, Baker MJ, et al. Sengers syndrome-associated mitochondrial acylglycerol kinase is a subunit of the human TIM22 protein import complex[J]. *Mol Cell*, 2017, 67(3):457-470.
- [12] Hu ZL, Qu GJ, Yu XY, et al. Acylglycerol kinase maintains metabolic state and immune responses of CD8⁺ T cells[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2):290-302.
- [13] Liu JL, Pestina TI, Berndt MC, et al. Botrocetin/VWF-induced signaling through GPIIb-IX-V produces TxA2 in an α IIb β 3- and aggregation-independent manner[J].

- Blood, 2005, 106(8):2750-2756.
- [14] Chen X, Zhang Y, Wang YH, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis[J]. Blood, 2013, 121(18):3718-3726.
- [15] Laurent PA, Hechler B, Solinhac R, et al. Impact of PI3K α (phosphoinositide 3-kinase α) inhibition on hemostasis and thrombosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(9):2041-2053.
- [16] O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, et al. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis[J]. Blood, 2011, 118(15):4215-4223.
- [17] Chen JH, De S, Damron DS, et al. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice[J]. Blood, 2004, 104(6):1703-1710.
- [18] Laurent PA, Séverin S, Hechler B, et al. Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate[J]. Blood, 2015, 125(5):881-888.
- [19] Weng Z, Li D, Zhang L, et al. PTEN regulates collagen-induced platelet activation[J]. Blood, 2010, 116(14):2579-2581.
- [20] Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks[J]. Oncogene, 2008, 27(41):5527-5541.
- (收稿:2022-01-05 修回:2022-09-27)
(本文编辑:胡晓静)

NO NSOMKING
THE LIFE WILL BE MORE BEAUTIFUL

不吸烟，生活更美好

