

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00452

# JNK 与 Akt 通路在夏枯草抑制人淋巴瘤细胞生长中的作用

## Roles of JNK and Akt pathways in inhibition of lymphoma cells by *Prunella vulgaris*

刘新奎<sup>1,3</sup>, 王琳<sup>2</sup>, 张明智<sup>3\*</sup>

1. 郑州大学第一附属医院病案管理科, 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院放疗科, 郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院肿瘤科, 郑州 450052

**[摘要]** **目的** 研究夏枯草对淋巴瘤细胞(Raji 细胞)生长的影响及可能的机制。**方法** 参考临床常用剂量,采用 50 g/L 夏枯草(夏枯草组)、50 g/L 夏枯草+20 μmol/L JNK 特异抑制剂 SP600125(SP600125 组)、50 g/L 夏枯草+1 μmol/L Akt 特异抑制剂 Wortmannin(Wortmannin 组)处理 Raji 细胞,以同体积生理盐水作为对照组,应用 MTT 法检测各组的细胞增殖率,蛋白免疫印迹法检测各组的 JNK 和 Akt 磷酸化水平。**结果** 夏枯草组细胞增殖率低于对照组( $P < 0.05$ ),SP600125 组细胞增殖率比夏枯草组增高( $P < 0.05$ ),Wortmannin 组细胞增殖率比夏枯草组降低( $P < 0.05$ );JNK 磷酸化水平在夏枯草组中明显升高( $P < 0.05$ ),SP600125 可以抑制其磷酸化( $P < 0.05$ ),Wortmannin 不能抑制其磷酸化( $P > 0.05$ );Akt 磷酸化水平在夏枯草组中降低( $P < 0.05$ ),SP600125 及 Wortmannin 均可抑制其磷酸化( $P < 0.05$ )。**结论** 夏枯草可以明显抑制 Raji 细胞的生长,这种抑制作用可能是通过激活 JNK 信号转导通路,抑制 Akt 通路激活实现的。

**[关键词]** 淋巴瘤; Raji 细胞; 夏枯草; JNK; Akt; 细胞增殖

**[中图分类号]** R 733.41

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0452-03

夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥成熟果穗,具有散结消肿之功效。体外实验提示该药能诱导人胃癌 SGC-7910 细胞株凋亡<sup>[1]</sup>,并对人肺癌细胞 A549 具有显著细胞毒作用<sup>[2]</sup>。本课题组先前曾证明夏枯草具有良好的体外抗淋巴瘤增殖<sup>[3]</sup>和诱导淋巴瘤细胞凋亡的作用<sup>[4]</sup>。许多研究表明,JNK 通路和 Akt 通路和细胞凋亡密切相关,本研究以人 B 淋巴瘤白血病细胞系 Raji 为靶细胞,研究夏枯草对其增殖的影响,并观察 JNK 通路和 Akt 通路在其中的作用,为临床应用夏枯草治疗淋巴瘤提供一定的实验依据。

### 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** 人 B 淋巴瘤 Raji 细胞株(中国科学院细胞研究所);夏枯草注射液(上海中医药大学附属曙光医院药厂提供,为单味夏枯草经水煎醇沉法制成的注射液,含生药 3 g/ml,符合《中华人民共和国药典》注射剂项下有关规定,批号为沪卫药剂 91-121,实验时用生理盐水稀释,调 pH 值至 7.0);MTT(美国 Sigma 公司);兔抗人 JNK 抗体、兔抗人 p-JNK(Thr183/Tyr185)抗体、兔抗人 Akt 抗体、鼠抗人 p-Akt(Ser473/587F11)抗体(美国 Cell Signaling 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 实验分组** 配制 1 000 g/L 的夏枯草溶液,实验时用生理盐水稀释,分为夏枯草组(50 g/L 夏枯草)、SP600125 组(50 g/L 夏枯草+20 μmol/L JNK 特异抑制剂 SP600125)、

Wortmannin 组(50 g/L 夏枯草+1 μmol/L Akt 特异抑制剂 Wortmannin)及对照组(同体积生理盐水)。

**1.3 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清的培养液常规培养 Raji 细胞株,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度,每 2 d 换液 1 次。

**1.4 MTT 法检测 Raji 细胞的生长变化** 取对数生长期的细胞经常规消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 2.5 × 10<sup>4</sup>/ml,接种于 96 孔板中,每孔 0.2 ml,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁,按实验设计处理细胞(每组设 6 个复孔,独立重复 3 次),随后放回 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 48 h;每孔加入 5 mg/ml MTT 液 20 μl,继续孵育 4 h,取出培养板,弃去 MTT 液,每孔加入 150 μl DMSO,微量震荡器震荡 10 min,使结晶物充分溶解,DMSO 调零后,在 492 nm 波长下用酶联免疫检测仪检测每孔的光密度值,按下列公式计算细胞生长增殖率:细胞生长增殖率=(实验组平均光密度值/对照组平均光密度值)×100%。

**1.5 蛋白印迹法检测 JNK 和 Akt 磷酸化水平** 各组细胞离心收集,将约 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞置于细胞裂解液(30 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氨, 2 mg/L 抑肽酶)中,在冰水浴中反复吹打使其破碎,4℃,11 255 × g 离心 10 min,吸取上清液,即为细胞提取液。进行总蛋白定量,调整蛋白浓度一致后,进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移至硝酸纤维素膜,分别以兔抗人 JNK 抗体、兔抗人 p-JNK(Thr183/Tyr185)抗体、兔抗人 Akt 抗体和鼠抗人 p-Akt(Ser473/587F11)抗体为一抗,再分别以

**[收稿日期]** 2009-09-15 **[接受日期]** 2009-12-08

**[作者简介]** 刘新奎,博士生. E-mail: liuxk888@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0371-66862937, E-mail: mingzhi\_zhang@126.com

辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和抗小鼠 IgG 为二抗,进行免疫印迹分析,ECL 显色后,应用 GeneTool 图像分析软件进行定量分析。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 对数据进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各处理因素对细胞生长的影响 MTT 法检测各组细胞增殖率,以对照组为 100%,夏枯草组、SP600125 组和 Wortmannin 组分别为  $(67.32 \pm 1.96)\%$ 、 $(97.14 \pm 1.25)\%$ 、 $(45.18 \pm 0.36)\%$ ;与夏枯草组比较,SP600125 组细胞增殖率增高,Wortmannin 组下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明夏枯草可明显抑制 Raji 细胞增殖,JNK 和 Akt 在其中起到一定作用。

2.2 各组 JNK 磷酸化水平的变化 各组在不同因素处理细胞后,采用蛋白印迹法检测 JNK 磷酸化水平,结果如图 1 所示,夏枯草组 JNK 的磷酸化水平  $(0.48 \pm 0.03)$  明显高于对照组  $(0.42 \pm 0.01, P < 0.05)$ ,加入 SP600125 后,JNK 磷酸化水平下降  $(0.43 \pm 0.002)$ ,与夏枯草组比较  $P < 0.05$ ,加入 Wortmannin 则无明显变化  $(0.47 \pm 0.05)$ ,与夏枯草组比较  $P > 0.05$ 。

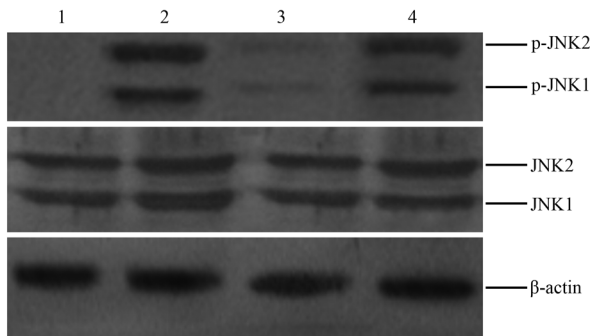


图 1 各组 JNK 的磷酸化水平

1:对照组; 2:夏枯草组; 3:SP600125 组; 4:Wortmannin 组

2.3 各组 Akt 磷酸化水平的变化 各组在不同因素处理细胞后,采用蛋白印迹法检测 Akt 磷酸化水平,结果如图 2 所示,夏枯草组 Akt 的磷酸化水平  $(0.73 \pm 0.02)$  低于对照组  $(1.63 \pm 0.01, P < 0.05)$ ;加入 SP600125 后,Akt 的磷酸化水平进一步降低  $(0.68 \pm 0.01)$ ,与夏枯草组比较  $P < 0.05$ ;加入 Wortmannin 后,Akt 的磷酸化几乎被完全抑制  $(0.00 \pm 0.00)$ ,与其他组比较  $P < 0.05$ 。

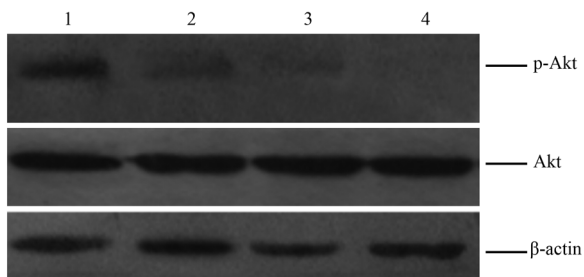


图 2 各组 Akt 的磷酸化水平

1:对照组; 2:夏枯草组; 3:SP600125 组; 4:Wortmannin 组

## 3 讨论

淋巴瘤的治疗以化疗为主,但大部化疗药物的疗效不尽如人意。细胞凋亡是机体免疫自稳和免疫监视功能的重要组成部分,对肿瘤的发生、发展及药物治疗有重要影响。诱导细胞凋亡是目前中草药抗肿瘤机制的研究热点。目前已经有多篇专利报道抗癌中成药的主要成分是夏枯草<sup>[5-7]</sup>。本研究采用 MTT 实验观察了夏枯草对 Raji 细胞增殖的影响。结果表明,夏枯草可明显抑制 Raji 细胞的增殖。

蛋白激酶介导信号转导通路的活化是细胞对周围环境变化的主要反应之一。蛋白激酶 JNK,静止时位于细胞质,相对分子质量为 54 000,一旦被激活,JNK 便由细胞质进入细胞核<sup>[8]</sup>。JNK 蛋白的磷酸化标志着 JNK 信号转导通路的激活<sup>[9]</sup>,本实验结果显示,JNK 信号转导通路被激活,并可被该通路的抑制剂抑制。

Akt 是 PI3K 信号途径的下游效应分子之一,是 PI3K 最主要的靶酶。Akt 蛋白上的苏氨酸磷酸化位点(Thr308)和丝氨酸磷酸化位点(Ser473)磷酸化而使其活化。激活后的 Akt 蛋白通过一系列的底物磷酸化,达到保护细胞生存和抗凋亡的重要作用<sup>[10]</sup>,在恶性肿瘤发生、发展过程中常可见到<sup>[11]</sup>。另外,多种细胞的生存、凋亡信号通过激活 PI3K/Akt 信号途径进行转导<sup>[12]</sup>,二者是促进细胞生存和维持细胞正常功能的关键信息分子。本实验中可以看出 Akt 通路受到抑制,Wortmannin 可以完全抑制其磷酸化,SP600125 可以部分抑制其磷酸化水平,结合 MTT 结果认为,夏枯草可以抑制 Akt 通路,导致细胞增殖率下降,Wortmannin 使得 Akt 通路的活性完全被抑制,从而使得细胞增殖率进一步降低,证明夏枯草可以抑制 Akt 通路的激活,提示夏枯草抑制淋巴瘤细胞增殖可能与抑制 Akt 通路活化有关。

研究表明,细胞信号转导通路之间可以相互调节<sup>[13]</sup>。PI3K/Akt 和 MAPK 通路作为与细胞生命活动密切相关的两条通路,可以交叉激活<sup>[14]</sup>。在内皮细胞,抑制 Akt 后,JNK 信号转导通路激活被上调<sup>[15]</sup>。小鼠胚胎成纤维细胞、3T3-L1 脂肪细胞等的研究证实,JNK 激活能磷酸化胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)Ser307 位点,进而反馈性抑制胰岛素刺激的 Akt 通路的活化<sup>[16]</sup>。Yuan 等<sup>[17]</sup>研究发现,活化的 Akt2 通过磷酸化细胞凋亡激活激酶(ASK1)的 Ser83 位点,阻断 ASK1 对 JNK/P38 的活化和促凋亡蛋白 Bax 基因构象的活性转化,在诱导卵巢癌细胞对顺铂耐药中发挥重要作用,Akt2、ASK1、JNK/P38 级联途径反映了胞内信号转导通路的“cross-talk(交谈)”效应。刘云峰等<sup>[18]</sup>研究证实,内皮细胞 JNK 信号转导通路对 Akt 通路存在调节作用。本研究显示 JNK 通路抑制剂 SP600125 可以部分抑制 p-Akt 的水平,但 Akt 通路抑制剂 Wortmannin 却不能抑制 p-JNK 的水平。目前各个通路之间关系的研究,尚无定论,不同条件下,各通路之间存在不同的关系。本研究证明夏枯草可以激活 JNK 信号转导通路,抑制 Akt 通路,导致细胞凋亡的发生,同时发现,在夏枯草治疗淋巴瘤的过程中,JNK 信号转导通路的激活可以调节 Akt 通路的活化状态。

综上所述,JNK 信号转导通路和 Akt 通路在夏枯草诱导淋巴瘤细胞凋亡中都起到了重要作用,而且 JNK 信号转导通路的激活对 Akt 通路的活化状态有调节,但其在诱导凋亡中的具体作用仍需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 王 琨,董惠芳,章晓鹰,周荣耀.夏枯草对 SGC-7901 细胞的影响[J].上海医学检验杂志,2000,15:305-306.  
 [2] Lee K H,Lin Y M,Wu T S,Zhang D C,Yamagishi T,Hayashi T,et al. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*,*Psychotria serpens*, and *Hypis capitata*; ursolic acid and related derivatives[J]. *Planta Med*,1988,54:308-311.  
 [3] 张明智,张可杰,王庆端,刘宏民,张雁冰.夏枯草对淋巴瘤细胞增殖的影响[J].医药论坛杂志,2007,28:54-55.  
 [4] 张可杰,张明智,王庆端,刘文励.夏枯草对 Raji 细胞生长和凋亡相关基因蛋白表达的影响[J].中药材,2006,29:1207-1210.  
 [5] 齐 杰,齐迎新.一种抗癌药物及其制备方法:中国,02117305.2[P].2002-04-17.  
 [6] 蔡绪旺.一种抗癌中药胶囊制剂:中国,1742866[P].2006-03-08.  
 [7] 李广淳.一种抗癌药及制备方法:中国,1733275[P].2006-02-15.  
 [8] 朱德森,付晓光.C-jun 氨基末端激酶在胃癌组织中的表达[J].辽宁医学院学报,2007,28:26-29.  
 [9] 骆颖慧,魏雪涛,尚兰琴,乔杨峥,郝长付,郝卫东.JNK/SAPK 信号转导通路在镉引起的 Hormesis 中的作用[J].毒理学杂志,2007,21:190-193.  
 [10] 方乐堃,曾宇慧,杨惠玲.PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路与泌尿系统肿瘤[J].国际内科学杂志,2007,34:509-513.  
 [11] 徐全胜,张家明,李宾公,王朝晖,王 祥.辛伐他汀对冠心病患

者内皮祖细胞增殖的影响及其机制初步探讨[J].心血管康复医学杂志,2007,16:271-274.  
 [12] 娄可心,刘宁波,彭 韬,冷 静.选择性环氧合酶抑制剂 celecoxib 对血管平滑肌细胞的增殖抑制、凋亡诱导作用和分子机制[J].南京医科大学学报:自然科学版,2007,27:530-533.  
 [13] 张 宁,狄 文.PI3K/Akt 转导途径与卵巢癌耐药[J].国外医学:妇产科学分册,2007,34:190-193.  
 [14] Mansouri A,Ridgway L D,Korapati A L,Zhang Q,Tian L,Wang Y,et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*,2003,278:19245-19256.  
 [15] Madge L A,Poher J S. A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cell[J]. *J Biol Chem*,2000,275:15458-15465.  
 [16] Lee Y H,Giraud J,Davis R J,White M F. c-JUN N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade[J]. *J Biol Chem*,2003,278:2896-2902.  
 [17] Yuan Z Q,Feldman R I,Sussman G E,Coppola D,Nicosia S V,Cheng J Q. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance[J]. *J Biol Chem*,2003,278:23432-23440.  
 [18] 刘云峰,杨 川,程 桦,黎明涛.高糖诱导人内皮细胞凋亡及其 JNK、Akt 信号途径的作用机制[J].基础医学与临床,2005,25:163-168.

[本文编辑] 孙 岩