

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01325

# FKN 刺激人单个核细胞 Akt 活化及 Akt 活化与 PI3K、NF- $\kappa$ B 的关系

## Fractalkine induced activation of Akt in human peripheral blood monocytes and its relationship with PI3K and NF- $\kappa$ B

侯文丽<sup>1</sup>, 孙 健<sup>2\*</sup>, 郑柳颖<sup>3</sup>

1. 吉林大学第一医院干部病房, 长春 130021

2. 吉林大学第二医院心内科, 长春 130041

3. 天津市第五中心医院心内科, 天津 300450

[关键词] FKN; 蛋白激酶 B; NF- $\kappa$ B; 卡托普利

[中图分类号] R 541.4 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)11-1325-03

Fractalkine(FKN)是新发现的一种在动脉粥样斑块中过量表达的趋化因子,与其受体 CX3CR1 结合,介导白细胞黏附和趋化以及血管平滑肌细胞(VSMC)的迁移,并刺激炎症因子的表达和血小板的活化,因此被认为参与介导动脉粥样硬化(AS)的炎症反应。蛋白激酶 B(PKB,又名 Akt)是与炎症和白细胞的趋化过程密切相关的信号分子,通过介导白细胞的黏附和趋化、VSMC 的迁移及血小板的活化而在 AS 的形成和进展中发挥作用。关于 FKN/CX3CR1 的信号转导机制目前尚不明确,本实验的前期工作已经证实,FKN 可以刺激人外周血单个核细胞 NF- $\kappa$ B 信号分子的活化<sup>[1,2]</sup>,本次通过研究 FKN 可否刺激人外周血单个核细胞 Akt 活化,以及磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、NF- $\kappa$ B 与 Akt 活化的关系,进一步探讨 FKN 的信号转导机制。

### 1 材料和方法

1.1 试剂 人外周血浓缩白细胞、SH30071 优等胎牛血清(FBS, Hyclone 公司)、青霉素(华北制药厂)、链霉素(华北制药厂)、1.077 g/ml 聚蔗糖-泛影葡胺分离液(Pharmacia 公司)、山羊抗兔 IgG(Santa Cruz)、重组人 Fractalkine(Cytolab 公司)、卡托普利纯品(中美上海施贵宝公司惠赠)、PDTC(Sigma 公司)、LY294002(Sigma 公司)、兔抗人磷酸化 Akt 抗体(Santa Cruz)、RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)、丽春红 S(上海生工生物工程技术有限公司)、GAPDH(Santa Cruz)、化学发光法(ECL)试剂盒(上海国药集团化学试剂有限公司生命科学部)。

1.2 分离人外周血单个核细胞(PBMCs) 无菌条件下,用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞。

1.3 实验分组 按上述方法分离人外周血单个核细胞后,以每孔  $1 \times 10^7$  个单个核细胞/2 ml 铺于 6 孔细胞培养板中,细胞随机分为 5 组,每组 3 个复孔。(1)空白对照组:单个核细胞置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。(2)FKN 诱导组:在单个核细胞培养液中加入 FKN,终浓度为 0.5  $\mu$ g/ml,37℃、

5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。(3)FKN+LY294002 组:在单个核细胞培养液中加入 LY294002,终浓度为 50  $\mu$ mol/L,作用 1 h 后,加入 FKN,终浓度为 0.5  $\mu$ g/ml,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。(4)FKN+PDTC 组:在单个核细胞培养液中加入 PDTC,终浓度为 15  $\mu$ mol/L,作用 1 h 后,加入 FKN,终浓度为 0.5  $\mu$ g/ml,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。(5)FKN+卡托普利组:在单个核细胞培养液中加入卡托普利,终浓度为 40 mg/L,作用 1 h 后,加入 FKN,终浓度为 0.5  $\mu$ g/ml,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。

1.4 Western 印迹方法检测各组单个核细胞内磷酸化 Akt 水平 FKN 加入 45 min 时应用 Western 印迹方法检测各组细胞内磷酸化 Akt 水平。将每组  $1 \times 10^7$  个单个核细胞用冷 PBS 清洗,加入 90  $\mu$ l 低渗裂解液,混匀,冰浴 30 min。加入 10  $\mu$ l 10%乙基苯基聚乙二醇(NP40),振荡 20 s,冰浴 2 min,然后 4℃,18 516 $\times$ g,离心 35 s 后取上清。Bradford 法测定蛋白浓度。取总蛋白 30  $\mu$ g,变性 3 min,配制 10 ml 12%的分离胶和 5 ml 5%积层胶,SDS-PAGE 胶分离蛋白,半干电转移法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,然后于脱脂奶粉中封闭过夜。兔抗人磷酸化 Akt 抗体以 1:500 稀释,将硝酸纤维素膜放入其中,室温下温和振荡 1 h, TBST 洗膜 3 次。1:2 000 稀释山羊抗兔抗体,将硝酸纤维素膜放入其中,室温放置 1 h, TBST 洗膜 3 次。在暗室中用 ECL 化学发光试剂盒进行曝光,扫描胶片,并用 Olympus AX70 图像分析系统进行积分光密度值分析,内参 GAPDH 检测同上。

1.5 统计学处理 采用 Bartlett 法证明各组方差齐性后,用方差分析和 SNK-*q* 检验进行组间两两比较。

### 2 结果

FKN 刺激 45 min 时,FKN 诱导组较空白对照组条带增粗,相对积分光密度值比空白对照组高(0.583 $\pm$ 0.131 vs 0.082 $\pm$ 0.020,  $P < 0.05$ );应用 LY294002 预刺激 1 h,磷酸化 Akt 与 FKN 诱导组相比,条带有增粗趋势,但其相对积分

[收稿日期] 2009-03-27 [接受日期] 2009-09-01

[作者简介] 侯文丽,硕士,住院医师. E-mail:houwenli1982@tom.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0431-88782647, E-mail:sunjianemail@126.com

光密度值( $0.693 \pm 0.059$ )与 FKN 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );应用 PDTC 预刺激 1 h,磷酸化 Akt 较 FKN 诱导组条带变细,其相对积分光密度值( $0.307 \pm 0.064$ )与 FKN 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );应用卡托普利干预,磷酸化 Akt 较 FKN 诱导组条带变细,其相对积分光密度值( $0.296 \pm 0.005$ )与 FKN 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见图 1。

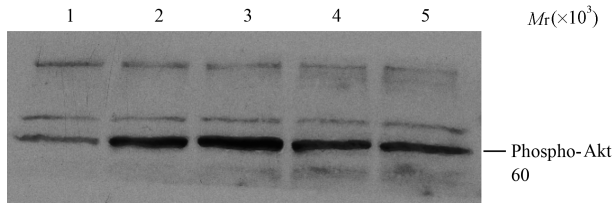


图 1 Western 印迹方法检测各组磷酸化 Akt 水平

1:空白对照组;2:FKN;3:FKN+LY294002;4:FKN+PDTC;5:FKN+卡托普利

### 3 讨论

FKN 是新发现的一种在动脉粥样斑块中过量表达的趋化因子,在 AS 形成过程中参与炎症反应,FKN 可以介导表达其受体 CX3CR1 的单核细胞、淋巴细胞、VSMC 等向损伤的血管内皮细胞黏附、趋化,并能跨越血管壁向血管外特定部位迁移<sup>[3-5]</sup>,FKN 还可以促进血小板活化,因此 FKN 被认为在动脉粥样硬化的形成和发展过程中起重要作用。

本课题组对 FKN 的信号转导机制进行了一系列研究,前期工作发现 FKN 可刺激人单个核细胞 NF- $\kappa$ B 表达增加,G-蛋白阻断剂 PTX、蛋白激酶 C(PKC)特异性阻断剂 RO31-8220 均可抑制该过程中 NF- $\kappa$ B 的表达<sup>[1-2]</sup>,由于 CX3CR1 是 G-蛋白偶联受体,推测 FKN 与受体 CX3CR1 结合后可能激活 G-蛋白/PKC/NF- $\kappa$ B 信号通路。

单个核细胞包括单核细胞和淋巴细胞,由于上述 2 种细胞均表达 FKN 的受体 CX3CR1,而且动脉粥样硬化的发生机制涉及单核细胞与淋巴细胞的黏附与趋化运动,故选择了单个核细胞作为研究对象。

PKB 约由 480 个氨基酸组成,该激酶被证明为致小鼠白血病的病毒癌基因  $v$ -akt 编码的蛋白产物,故又称 Akt,Akt 可以作用于肌动蛋白,使细胞膜结构发生改变,促进细胞黏附和趋化,Akt 的活性变化是导致血小板聚集及维持血小板活化状态的重要基础,可以导致血小板释放活性物质和血小板黏附聚集<sup>[6]</sup>,而 FKN 可介导单核细胞、淋巴细胞等的黏附、趋化运动,故推测 FKN 刺激单个核细胞可能导致 Akt 活化,进而促使单个核细胞产生趋化运动。Akt 活化并非表达增加,而是磷酸化,故本实验对磷酸化 Akt 进行了检测。本实验发现 FKN 刺激后单个核细胞内磷酸化 Akt 水平升高,与空白对照组相比差异有统计学意义,说明 FKN 可以引起单个核细胞内 Akt 信号分子的磷酸化,即 FKN 刺激单个核细胞可以活化 Akt,那么,PI3K 是否为该过程中 Akt 的上游信号分子呢?

本实验采用 PI3K 特异性阻断剂 LY294002 预处理单个核细胞后,检测 FKN 对磷酸化 Akt 的活化作用,与预期结果相反,磷酸化 Akt 水平未见减少,与 FKN 诱导组相比,差异无

统计学意义。PI3K 与 Akt 的上下游关系已经得到了国内外学者的认同,本实验结果与预测不同,分析有如下可能:(1)在 FKN 刺激单个核细胞 Akt 活化的过程中,PI3K 不是其上游信号分子,已有研究发现,Akt 除了 PI3K 作为经典的上游信号分子,尚有其他激活途径,有人证明毛喉素和前列腺素 E1 可以通过激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 PKA 激活 Akt,渥曼青霉素作为 PI3K 的抑制剂不能抑制 Akt 的活化<sup>[7]</sup>,另外,本课题组在前期工作中发现 FKN 作用于单个核细胞,可激活 PKC<sup>[1-2]</sup>,而且已有研究发现 PKC/Akt 信号通路在许多细胞生命活动过程中发挥作用<sup>[8-10]</sup>,如 Namgaladze 等<sup>[8]</sup>发现,磷脂酶 A 所修饰低密度脂蛋白(PLA-LDL)可诱导 THP-1 单核细胞 Akt 磷酸化,PKC 阻断剂可抑制该过程中 Akt 的活化,故推测 PKC 可能为 FKN 刺激单个核细胞 Akt 活化的上游信号分子,该假设尚需进一步研究证实;(2)在 FKN 刺激单个核细胞 Akt 活化的过程中,PI3K 是 Akt 的上游信号分子,但是在本实验中,由于阻断剂的细胞特异性、作用时间不当、作用浓度不当等因素,导致 LY294002 未能起到阻断 PI3K 的作用。因此,在 FKN 促使单个核细胞内 Akt 活化的过程中,PI3K 是否为 Akt 的上游信号分子尚需进一步研究。

本实验应用 NF- $\kappa$ B 的阻断剂 PDTC 来阻断 NF- $\kappa$ B 的作用,应用 Western 印迹方法检测 PDTC 预处理的单个核细胞被 FKN 刺激后 Akt 的活化情况,结果发现 FKN+PDTC 组与 FKN 组相比,Akt 的活化受到抑制,可以得出结论,NF- $\kappa$ B 对于 FKN 刺激引起的 Akt 活化起促进作用。本实验的前期研究工作已经证实,FKN 可以刺激单个核细胞 NF- $\kappa$ B 信号分子的活化<sup>[1-2]</sup>,结合本实验结果,得知 FKN 刺激人单个核细胞后,可以引起 NF- $\kappa$ B 和 Akt 的活化,但是难以确定 NF- $\kappa$ B 即为 Akt 的上游信号分子,这是由于 NF- $\kappa$ B 活化后,将与 I $\kappa$ B 复合体解离,并进入核内,诱导相关基因转录,根据 NF- $\kappa$ B 的活化机制,NF- $\kappa$ B 应是多数信号分子在细胞核外信号转导过程中的下游分子,而且已有多个研究证实,NF- $\kappa$ B 在很多信号转导过程中为 Akt 的下游分子<sup>[11-12]</sup>。结合理论、前人研究和本实验结果,推测在 FKN 刺激单个核细胞 Akt 活化的过程中,NF- $\kappa$ B 不应为 Akt 的上游分子,而只是对于 Akt 的活化具有正向调节作用,这种机制可能是下游分子对于上游分子的反馈调节作用。本课题组拟应用 Akt 阻断剂检测 FKN 刺激单个核细胞后 NF- $\kappa$ B 的活化情况,以确定 Akt 是否为 NF- $\kappa$ B 的上游信号分子。

本实验应用卡托普利预处理单个核细胞,采用 Western 印迹方法检测 FKN 刺激单个核细胞后 Akt 的活化情况,结果发现 FKN+卡托普利组与 FKN 组相比,Akt 的活化受到抑制。本实验加用卡托普利的目的,是研究 ACEI 类药物是否对于 FKN 的信号转导过程有干预作用。根据本实验结果,可以得出结论,卡托普利可以减轻 FKN 刺激单个核细胞引起的 Akt 活化。卡托普利可否抑制 FKN 诱导的单个核细胞趋化和黏附运动尚需进一步研究证实。

综合本实验结果,FKN 可激活人外周血单个核细胞内 Akt 信号分子,使之磷酸化,PI3K 在该过程中是否为 Akt 的上游信号分子尚需进一步研究,NF- $\kappa$ B 信号分子对于 Akt 的激活具有向上调节作用,卡托普利可抑制 FKN 诱导的 Akt

活化, 结合本实验的前期研究结果<sup>[1-2]</sup>, 作出如下推测, FKN—PKC、Akt、NF- $\kappa$ B—单个核细胞黏附、趋化—动脉粥样硬化, 而 PKC、Akt、NF- $\kappa$ B 之间还可能构成复杂的网络关系, 梳理 FKN 刺激单个核细胞的信号转导关系网, 并了解 ACEI 类药物对该信号转导过程的干预作用, 尚需要进一步实验。

#### [参考文献]

- [1] 孙 健, 张文琪, 郑柳颖, 雷明明, 陈玉花, 郭惠娇, 等. Fractalkine 影响动脉粥样硬化信号的转导机制及卡托普利的干预作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2008, 34: 1013-1017.
- [2] 郑柳颖, 孙 健, 雷明明, 郭惠娇, 侯文丽, 吴 哲. 趋化因子 FKN 对外周血单核细胞 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达的影响及蛋白激酶 C 在其中的作用[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30: 310-313.
- [3] Zeng Y, Huebener N, Fest S, Weixler S, Schroeder U, Gaedicke G, et al. Fractalkine (CX3CL1) - and interleukin-2-enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T cells and natural killer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67: 2331-2338.
- [4] El-Shazly A, Berger P, Girodet P, Ousova O, Fayon M, Vernejoux J, et al. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma[J]. J Immunol, 2006, 176: 1860-1868.
- [5] Yano R, Yamamura M, Sunahori K, Takasugi K, Yamana J, Kawashima, M, et al. Recruitment of CD16<sup>+</sup> monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients[J]. Acta Med Okayama, 2007, 61: 89-98.
- [6] 富 萍, 胡 静, 李廷富, 于秉治, 宗志宏. 老年冠心病患者血小板蛋白激酶 B 的活性变化[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31: 301.
- [7] Filippa N, Sable C L, Filloux C, Hemmings B, Obberghen E V. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 4989-5000.
- [8] Preiss S, Namgaladze D, Brüne B. Critical role for classical PKC in activating Akt by phospholipase A2-modified LDL in monocytic cells[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73: 833-840.
- [9] Wu D, Feng F, Zhang B, Ingram A, Kelly D, Gilbert R, et al. PKC- $\beta$ 1 mediates glucose-induced akt activation and TGF- $\beta$ 1 upregulation in mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20: 554-566.
- [10] Wu D, Feng F, Zhang B, Ingram A, Kelly D, Gilbert R, et al. EGFR-PLC $\gamma$ 1 signaling mediates high glucose-induced PKC $\beta$ 1-Akt activation and collagen I upregulation in mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297: F822-F834.
- [11] Lu Y, Wahl L M. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. J Leukoc Biol, 2005, 78: 259-265.
- [12] Ke R H, Xiong J, Liu Y, Ye Z R. Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF- $\kappa$ B pathway *in vitro* [J]. Neurosci Res, 2009[Epub ahead of print].

[本文编辑] 尹 茶