

以 NF- κ B 为靶的药物筛选方法的 建立与应用研究*

马艳霞 徐波 崔景荣** 王鹂 吴军 李敏**

(北京大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 核转录因子 κ B (NF- κ B) 通过调节其靶基因的表达, 在机体免疫应答、炎症与肿瘤的发生发展过程中发挥着重要功能, 因此也被认为是预防和治疗肿瘤与炎症的理想靶点. pNiFty-SEAP 质粒被成功地转入 HEK293 细胞, 因此该转染细胞含有 5xNF- κ B 基序的增强子、SEAP 报告基因和 Zeocin 抗生素抗性筛选基因. 通过检测报告基因表达水平可反映 NF- κ B 的活化状态. 在以 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞为基础建立的筛选体系中, TNF α 和 PMA 等已知的 NF- κ B 激活剂能剂量与时间依赖性地促进 NF- κ B 的活化, 而 PDTC 和 NAC 等 NF- κ B 抑制剂的作用则相反. 该筛选体系不仅具有稳定、特异、高通量等特点, 而且可同时检测 NF- κ B 的激活剂与抑制剂, 将为发现作用于 NF- κ B 信号传导通路的抗肿瘤与免疫调节药物提供有效的实验方法.

关键词 NF- κ B, 分泌型胎盘碱性磷酸酶, 炎症, 肿瘤, 药物筛选

学科分类号 R965.1

核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通过调控多种基因的表达, 参与免疫反应、炎症反应、细胞凋亡、肿瘤发生与转移等多种生物进程^[1,2]. 在静息状态下, NF- κ B 在胞浆内与其抑制因子 I κ Bs 结合形成复合物, 处于非活化状态. 当细胞受到各种细胞内外刺激因素的作用时, I κ Bs 被 I κ B 磷酸化激酶复合物 (IKK) 磷酸化后, 与泛素蛋白结合, 再经蛋白酶体降解, 从而使得 NF- κ B 释放出来, 并进一步转位到细胞核内, 处于活化状态^[3]. 近年来随着分子生物学技术的发展, 在研究 NF- κ B 通路如何影响肿瘤细胞凋亡及如何决定其凋亡相关元件的表达增强或抑制方面已取得一定进展. 越来越多的研究显示, NF- κ B 的活化使得细胞增殖与凋亡之间的平衡被打破而倾向于抑制细胞凋亡促使肿瘤细胞恶性变, 因而在肿瘤的发生发展中起到了十分关键的调节作用^[4]. 另外, NF- κ B 在机体的免疫应答及炎症反应中也具有十分重要的地位. NF- κ B 不仅与重要免疫器官的发育密切相关, 还参与重要免疫受体、免疫球蛋白、炎症相关细胞因子(肿瘤坏死因子、白细胞介素、粘附分子、趋化因子、集落刺激因子等)表达的调节. 此外, NF- κ B 还参与急性时相蛋白表达的调控以及体内抗

原的提呈^[5]. 针对这些机制研制新型的分子靶点药物将为肿瘤和炎症防治开辟一条新的途径. 因此, 有必要建立快速与特异的 NF- κ B 活性检测方法, 发现以 NF- κ B 为靶点的化合物.

Moon 等^[6]将 pNF- κ B-SEAP-NPT 质粒转染入人角化细胞株 HaCaT 中, 该转染细胞能在 NF- κ B 活化的情况下诱导分泌型胎盘碱性磷酸酶 (SEAP) 报告基因的表达. 该实验系统采用 SEAP 荧光底物对人皮肤细胞 NF- κ B 活性进行量化检测, 并且能应用于各种合成与天然化合物的筛选, 发现治疗皮肤病的抗炎药物. 最近, Leung 等^[6]向肝癌细胞 (HepG2) 转入荧光酶报告基因 pBIIX-luc (包含有两个衔接的重复 NF- κ B 结合位点) 和 pRL-TK 质粒载体. 通过双荧光素酶报告基因检测系统来检测细胞培养上清中萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活

*国家高技术研究发展计划(863)新药筛选及关键技术研究(2002AA2Z343C)和中法先进性研究计划资助课题(PRA-B-02-01).

** 通讯联系人.

李敏, Tel: 010-82801161, E-mail: limin@bjmu.edu.cn

崔景荣, Tel: 010-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-28, 接受日期: 2005-08-31

性, 从而反映 NF- κ B 的转录活性. 利用该检测系统, 研究人员从中草药冬凌草 (*Isodon rubescens*) 中发现了一些对 NF- κ B 转录活性具有抑制作用的二萜类化合物. 为了直接检测反映 NF- κ B 活性的报告分子, 王付龙等^[7]建立了 NF- κ B 反应性不稳定增强型绿色荧光蛋白(d2EGFP)报告系统, 可作为筛选 NF- κ B 拮抗药物及研究其相关信号传导途径的工具. 另有报道, 将构建的能表达 I κ B α -EGFP 融合蛋白的基因重组体 p I κ B α -EGFP 转染人白血病细胞株 HL60 后, 通过定性与定量的方法, 观察不同刺激物作用该细胞后荧光强度的变化, 可直接了解 I κ B α -EGFP 蛋白的降解情况, 从而间接判断经刺激剂作用后细胞内 NF- κ B 的活化状态, 可用于筛选 NF- κ B 激活剂^[8].

虽然以报告基因与转染技术为基础, 通过检测融合蛋白或报告基因产物的表达量来反映 NF- κ B 活性的多种检测方法已经建成并用于药物筛选研究, 但难以在一次试验中同时发现 NF- κ B 活性激活剂与抑制剂. 本文以转染细胞 NiFty-SEAP/HEK293 为基础, 配合一定浓度的肿瘤坏死因子 α (TNF α) 建立了新的检测方法, 并应用于化合物筛选.

1 材料与方 法

1.1 细胞

转染 pNiFty-SEAP 质粒 (其中含有 5 个重复的相互衔接的 NF- κ B 结合位点) 的人胚胎肾皮质细胞 pNiFty-SEAP/HEK293 由法国医学科学研究院 Dr.Davrinche 惠赠. 人胚胎肾皮质细胞 (HEK293) 细胞购自美国 ATCC.

1.2 药品及抗体

肿瘤坏死因子 α (TNF α), 氟波酯(PMA), 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC), N-乙酰半胱氨酸(NAC), 对硝基苯磷酸(pNPP, p-Nitrophenyl phosphate) 等化学试剂均购自 Sigma 公司; DMEM 培养液, 抗生素 Zeocin 购自 R&D 公司.

1.3 SEAP 报告基因检测

通过检测 TNF α 等阳性化合物刺激 HEK293 细胞以及相应的转染细胞 pNiFty-SEAP/HEK293 所获培养上清中 SEAP 活性推测 NF- κ B 活化状态.

1.3.1 细胞培养. HEK293 细胞用含 10%胎牛血清, 双抗 (100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素) 的标准 DMEM 培养液培养. 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 混合气体孵育箱中培养, 隔天换液, 每 2~4 天传代 1 次.

pNiFty-SEAP/HEK293 细胞培养同 HEK293 细胞, 但培养液中需添加终浓度为 200 mg/L 的 Zeocin 作为筛选抗生素.

1.3.2 细胞培养上清样品的制备. 为了将实验体系同时应用于 NF- κ B 活性激活剂与抑制剂的筛选, 采用两种方法制备上清样品: (1) 取对数生长期细胞接种于 24 孔板中, 每孔 1 ml, 密度为 1×10^6 个 cell/ml, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 更换新鲜培养液, 再加入相应的化合物培养 12~24 h, 吸出各孔培养液, 离心(1 000 r/min) 5 min, 收集上清液 (约 800 μ l), 立即于 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 5~10 min, 灭活内源性碱性磷酸酶. 将灭活后的上清样品分装成两管, 立即检测或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用. 该方法主要用于筛选 NF- κ B 激活剂. (2) 实验过程同(1), 但需先加入待测化合物, 使待测化合物与转染细胞共培养 30 min 后, 再加入 TNF α (0.2 μ g/L), 共同培养 12~24 h 收集上清样品. 该方法可同时用于筛选 NF- κ B 抑制剂与激活剂.

1.3.3 检测相应化合物处理后 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞培养上清中 SEAP 的表达水平. 向 96 孔板中加入反应体系: 每孔上清样品 10 μ l, 10 \times 反应缓冲液(1 mol/L 甘氨酸, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L ZnCl₂, pH 10.4) 22 μ l, 蒸馏水 168 μ l. 每一样品设 3 个复孔. 将 96 孔培养板放入湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中反应 10 min, 然后加入底物 pNPP (终浓度 2.84 g/L) 20 μ l, 并将 96 孔培养板继续放入湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min. 取出 96 孔板后于 405 nm 波长下检测吸光度值 (A 值), 以 A 值代表各检测样品 (培养上清) 中 SEAP 的表达水平, 从而间接反映 NF- κ B 的活化水平. 将此值与阳性对照 (TNF α), 阴性对照 (PBS) 孔所得结果进行比较, 可初步判断化合物对 NF- κ B 活性的影响, 或以 SEAP 表达量 (A_{405} 值) 升高和降低值计算增高率和抑制率. 增高率 = (待测化合物与 TNF α 孔 A 值 - TNF α 对照孔 A 值) / TNF α 对照孔 A 值 \times 100%; 抑制率 = (TNF α 对照孔 A 值 - 待测化合物与 TNF α 孔 A 值) / TNF α 对照孔 A 值 \times 100%. 每个实验重复 3 次, 试验结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示.

1.4 NF- κ B 激活剂与抑制剂对 SEAP 报告基因表达的影响

将已知的 NF- κ B 激活剂 TNF α 、PMA 与抑制剂 PDTC、NAC 分别作用于 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞, 观察它们对 SEAP 报告基因表达的影响, 进而了解其激活或者抑制 NF- κ B 活化的特性. 每一试

验浓度或作用时间点均设 3 个复孔. 每个实验重复 3 次, 试验结果以($\bar{x} \pm s$)表示. 用配对 t 检验进行统计学处理, 计算样品或阳性药组与对照组之间差异的显著性.

1.5 筛选方法的优化

为了将试验体系应用于高通量筛选 NF- κ B 激活剂与抑制剂, pNiFty-SEAP/HEK293 细胞的培养条件、药物作用时间、显色反应体系与反应时间等因素得到了优化, 使之适用于 96 孔板进行高通量筛选.

2 结 果

2.1 SEAP 检测

为了证明 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞中 NF- κ B 的激活, 进而启动 SEAP 报告基因表达的特异性, 试验以不同浓度的 TNF α (0.05~0.8 μ g/L) 分别作用于 pNiFty-SEAP/HEK293 和 HEK293 细胞 24 h, 观察 SEAP 分泌量. 图 1 结果显示, 随着 TNF α 浓度增加, pNiFty-SEAP/HEK293 细胞分泌 SEAP 量增加. 而 HEK293 细胞分泌 SEAP 量保持在较低水平. 并且经同一浓度 TNF α 作用后的 HEK293 细胞分泌的 SEAP 量与 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞相比具有显著性差异.

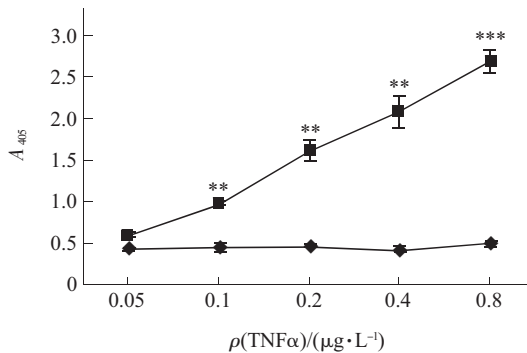


Fig. 1 SEAP secretion induced by different concentrations of TNF α in HEK293 cells and pNiFty-SEAP/HEK293 cells (24 h)

■—■: pNiFty-SEAP/HEK293; ◆—◆: HEK293. * Compared with negative control, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 NF- κ B 活化激活剂的检测

2.2.1 TNF α 对 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞 NF- κ B 活性的激活作用. 为了证明 TNF α 对 NF- κ B 的激活作用, 不同浓度的 TNF α 分别作用于转染细胞, 或相同浓度 TNF α 与转染细胞作用不同时间, 收集上清检测 SEAP 酶活性. 图 1 结果表明, TNF α 能剂量依赖性增加 SEAP 表达, 0.1 μ g/L 组与阴性对照

组相比具有显著性差异($P < 0.01$). 未加 TNF α 刺激的 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞 (control) 随着培养时间的延长, SEAP 分泌量无明显变化, 表明该细胞系无 SEAP 自发分泌. 与 PBS 对照组相比, TNF α (0.2 μ g/L) 随着作用时间的延长, 显著促进 SEAP 的分泌 (图 2).

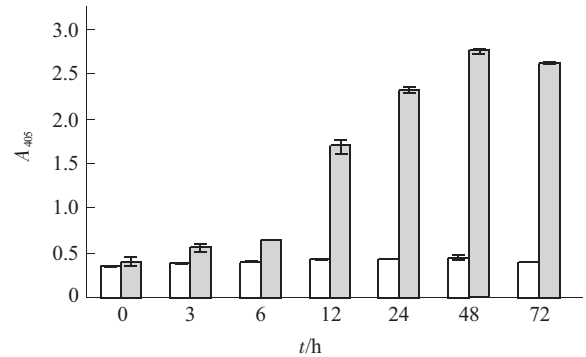


Fig. 2 Time-effect relationship of TNF α (0.2 μ g/L) on SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells
□: PBS; ■: TNF α (0.2 μ g/L).

2.2.2 PMA 对 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞 NF- κ B 活性的激活作用. 依方法 (1) 收集样品, 结果显示, 随着药物浓度的增加, 以及 PMA (10 μ mol/L) 与细胞作用时间的延长, SEAP 分泌呈现逐渐上升趋势, 具有浓度和时间的依赖性 (图 3, 图 4).

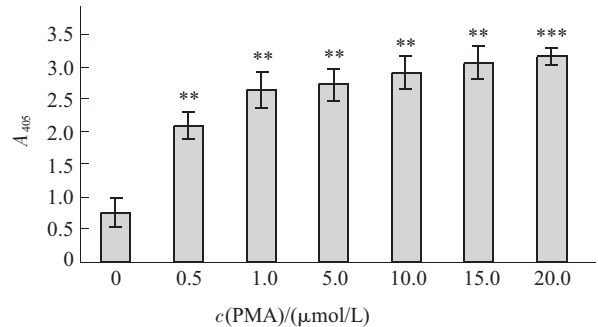


Fig. 3 Dose-effect relationship of PMA on SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells (24 h)

* Compared with negative control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

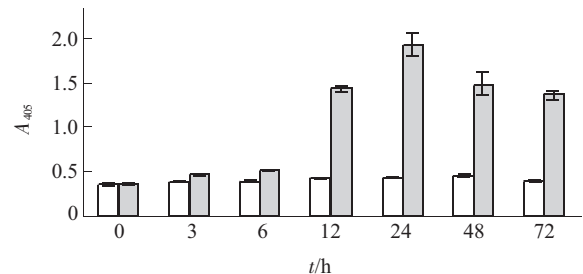


Fig. 4 Time-effect relationship of PMA (10 μ mol/L) on SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells

□: PBS; ■: PMA (10 μ mol/L).

2.3 NF-κB 活性抑制剂的检测

2.3.1 PDTC 对 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞 NF-κB 活性的抑制作用. PDTC 是最常用的 NF-κB 抑制剂之一, 我们采用方法(2)收集细胞培养上清, 观察实验体系对 NF-κB 抑制剂的筛选检测作用(图 5). 为了准确反映相同浓度 PDTC 随着作用时间的延长, 对 TNFα 所致 SEAP 分泌增加的抑制作用, 每一时间点均设 TNFα 对照孔, 计算抑制率(图 6).

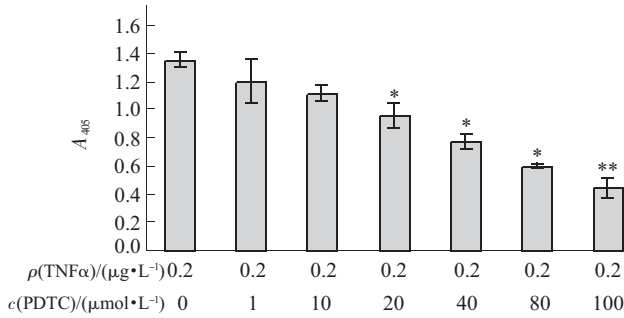


Fig. 5 Inhibitory effect of PDTC on SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells (24 h)

* Compared with positive control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

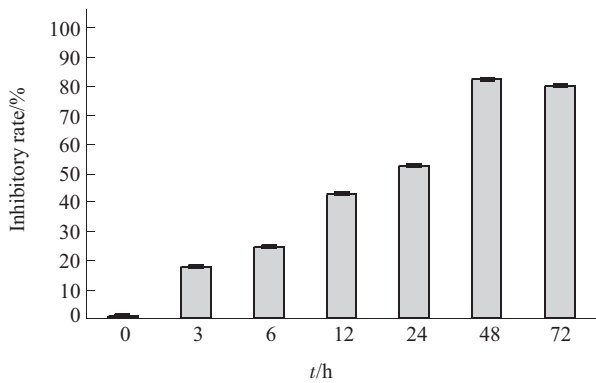


Fig. 6 Time-effect relationship of PDTC (20 μmol/L) on inhibition of SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells

2.3.2 NAC 对 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞 NF-κB 活性的抑制作用. 抗氧化剂 NAC 也是抑制 NF-κB 活性的代表性化合物之一, NAC 对 pNiFty-SEAP/HEK293 转染细胞作用的研究方法同 PDTC. 图 7 显示, 随着 NAC 浓度的升高, 其对 TNFα 诱导 NF-κB 活化的抑制作用也增强, 5 μmol/L 的 NAC 即具有统计学上的显著性抑制作用. 图 8 显示, 同一浓度的 NAC (10 μmol/L) 作用不同时间, 随着其作用时间的延长, 对 TNFα 诱导的 NF-κB 活化的抑制率也增高, 作用 24 h 达到最高, 抑制率为 64.55%. 这些结果表明, NAC 呈剂量与时间依赖性

地抑制 TNFα 诱导的 NF-κB 活化.

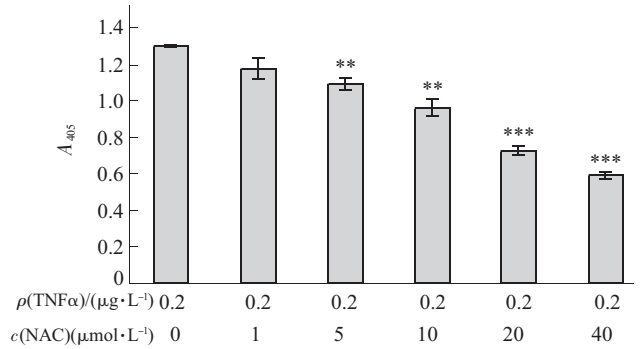


Fig. 7 Inhibitory effect of NAC on SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 Cells (24 h)

* Compared with positive control, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

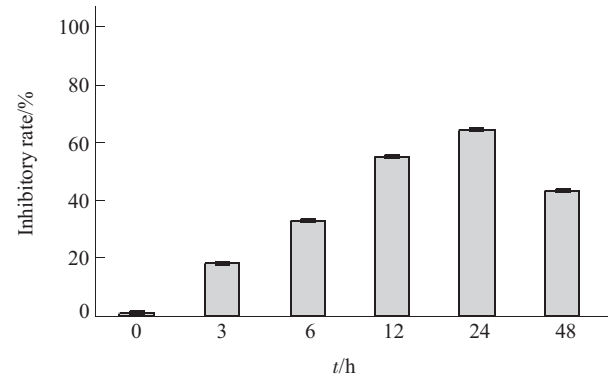


Fig. 8 SEAP time-effect relationship of NAC (10 μmol/L) on inhibition of SEAP secretion by pNiFty-SEAP/HEK293 cells

3 讨 论

由于 NF-κB 具有广泛的生理功能, 尤其与免疫应答和肿瘤的发生发展关系密切, 并且在肿瘤的治疗中, NF-κB 抑制剂能起到较好地辅助常规放、化疗的作用, 因此, NF-κB 是备受人们关注的药物作用靶点.

实验结果表明, TNFα 可剂量依赖性地促进 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞的 SEAP 报告基因的表达, 而对 HEK293 细胞无明显地诱导 SEAP 表达的作用(图 1), 表明了该实验方法的特异性. pNiFty-SEAP/HEK293 细胞在没有刺激剂作用下培养 72 h 后, SEAP 表达水平无明显变化(图 2, 图 4), 说明无 SEAP 自分泌现象, 是以此细胞建立稳定的检测方法的前提. 由于 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞几乎无自身 NF-κB 活化作用, 当 TNFα 和

PMA等 NF- κ B 激活剂作用于该细胞后, NF- κ B 活化, SEAP 分泌明显升高, 由此可判断待测化合物的 NF- κ B 激活作用. 然而, PDTC 和 NAC 等 NF- κ B 抑制剂单一处理 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞时, 细胞培养上清中 SEAP 的表达水平较对照虽有所降低, 但是差异不明显, 难以直接获得待测化合物对 NF- κ B 活性抑制作用的准确信息. 为了能有效地发现 NF- κ B 活性抑制剂, 在实验体系中引入 TNF α , 使 NF- κ B 活化至一定水平, 既提高了试验体系中 SEAP 基础水平, 有利于发现待测化合物的 NF- κ B 抑制作用. 0.2 μ g/L 的 TNF α 对 NF- κ B 的激活只能达到中等水平, 其他化合物仍有活化 NF- κ B 的空间, 因此, 本检测方法也可检测 NF- κ B 激活剂. 与其他的以 NF- κ B 为靶点的筛选方法相比, 本文新建的检测方法不仅提高了筛选 NF- κ B 抑制剂的敏感性, 而且能同时检测激活或抑制 NF- κ B 的化合物, 扩大了筛选方法的应用范围.

我们的实验结果还显示, TNF α 和 PMA 等已知的 NF- κ B 激活剂, 能剂量与时间依赖性地诱导 NF- κ B 的活化, 而 PDTC 和 NAC 等 NF- κ B 抑制剂的作用则相反, 能抑制 TNF α 诱导 NF- κ B 活化的作用. 药物作用 24 h 时, 对 NF- κ B 的活化或抑制作用可达到或近乎达到最高水平, 实验结果稳定, 有利于大量化合物的筛选.

TNF α 是最有效的抗肿瘤细胞因子, 对细胞凋亡的影响也通过 NF- κ B 调节^[9]. 因此, 引入 TNF α 以 NF- κ B 为靶的筛选方法还可同时发现 TNF α 的协同剂与拮抗剂, 有利于药物相互作用分子机制的研究. 应用所建筛选体系, 我们对 60 种针对 TNF α 活性设计合成的化合物进行 NF- κ B 活性诱导作用筛选, 发现 8 种化合物具有诱导的 NF- κ B 活性诱导作用, 1 种化合物具有 NF- κ B 活性抑制作用(结果未显示). 当然, 应用该筛选体系所得到的阳性化合物对 NF- κ B 通路的具体作用环节与相关的分子机制、化合物结构与功能关系等, 还需采用其他研究手段进行深入研究.

总之, 以 pNiFty-SEAP/HEK293 细胞为基础建立的筛选体系中引入了一定浓度的 TNF α , 使得在

一种筛选方法中同时检测 NF- κ B 激活剂与抑制剂成为可能. 实验采用 SEAP 的颜色底物 pNPP 作为 NF- κ B 活性的间接指示剂, 采用普通酶标仪即可检测, 便于推广. 此外, 本实验可利用 96 孔板进行高通量筛选. 以 NF- κ B 为靶点的特异、敏感、高通量药物筛选方法将有助于发现新型的肿瘤防治与免疫调节剂.

致谢 感谢法国医学科学院 (INSERM563, CHU Purpan, BP3028, 31054 Toulouse, France) Dr. Davrinche 惠赠转染细胞株 pNiFty-SEAP/HEK293.

参考文献

- Bharti A C, Aggarwal B B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64** (5-6): 883-888
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 2004, **25** (6): 280-288
- Yamamoto Y, Gaynor R B. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med*, 2001, **1**(3): 287-296
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5** (4): 297-309
- Moon K Y, Hahn B S, Lee J, *et al.* A cell-based assay system for monitoring NF-kappaB activity in human HaCaT transfectant Cells. *Anal Biochem*, 2001, **292** (1): 17-21
- Leung C H, Grill S P, Lam W, *et al.* Novel mechanism of inhibition of NF-kappaB DNA-binding activity by diterpenoids isolated from *isodon rubescens*. *Mol Pharmacol*, 2005, **68** (2): 286-297
- 王付龙, 梁华平, 刘 昕, 等. 核因子 - κ B 反应性不稳定增强型绿色荧光蛋白报告系统的建立与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 78-83
Wang F L, Liang H P, Liu X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 78-83
- 史 须, 马炳娜, 钟英诚, 等. NF- κ B 活化诱导剂筛选细胞的建立. *中国免疫学杂志*, 2002, **18** (4): 245-248
Shi X, Ma B L, Zhong Y C, *et al.* *Chinese Journal of Immunology*, 2002, **18** (4): 245-248
- Kutuk O, Basaga H. Aspirin inhibits TNF α - and IL-1-induced NF- κ B activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis. *Cytokine*, 2004, **25** (5): 229-237

Establishment and Application of a Screening Assay Based on NF- κ B Signal Transduction*

MA Yan-Xia, XU Bo, CUI Jing-Rong**, WANG Li, WU Jun, LI Min**

(National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract NF- κ B has been reported to play an important role in immunity, inflammation and carcinogenesis by regulating expression of its target genes. Thus, NF- κ B was recognized as a promising target for the prevention and treatment drugs against cancer and inflammation. NF- κ B sequence, reporter gene SEAP and selection gene for Zeocine resistance in plasmid pNiFty-SEAP were transfected into HEK293 cells. Therefore, NF- κ B activity was able to be evaluated by SEAP activity in the transfected cells. Based on pNiFtySEAP/HEK293 cells, a screening assay was established, by which known NF- κ B stimulators TNF α and PMA were demonstrated to activate the NF- κ B in dose and time dependent manners. In contrast, NF- κ B inhibitors PDTC and NAC showed inhibitory effects on the NF- κ B activity in indicated doses and times. Except several characteristics such as stability, sensitivity, sepecificity, the assay was capable to screen both agents inducing and inhibiting NF- κ B activity at the same experiment, which will be useful for the discovery of compounds targeting NF- κ B signal pathway.

Key words NF- κ B, SEAP, inflammation, cancer, drug screening

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Programme of China(2002AA2Z343C) and Programme de Recherches Avancees(PRA) (PRA-B-02-01).

**Corresponding author .

LI Min, Tel: 86-10-82801161, E-mail: limin@bjmu.edu.cn

CUI Jing-Rong, Tel: 86-10-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

Received: July 28, 2005 Accepted: August 31, 2005