



# NF- $\kappa$ B 在马钱子碱抑制非小细胞肺癌细胞 环氧化酶 2 生成中的作用研究

朱国民<sup>1,2</sup>, 殷放宙<sup>3</sup>, 邓旭坤<sup>2\*</sup>

(1. 南京市高淳县人民医院 检验科, 江苏 南京 211300;

2. 中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074; 3. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨马钱子碱抑制环氧化酶 2(COX-2),从而诱导非小细胞肺癌细胞凋亡的分子机制。方法:构建 COX-2 启动子若干转录因子缺失突变体与含 COX-2 mRNA 3'-UTR 的报告质粒,与 Renilla 共转染至非小细胞肺癌 A549 细胞,测报告基因 luciferase 活性研究 COX-2 启动子受马钱子碱抑制的最小顺式作用元件;采用蛋白质免疫印迹法研究马钱子碱对 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化与 p65 进核的影响。结果:马钱子碱显著性抑制 LPS 诱导的 COX-2 启动子的激活,而对 COX-2 mRNA 转录后调控影响不大,COX-2 启动子-262 位附近 NF- $\kappa$ B 是马钱子碱抑制 COX-2 启动子活性的重要顺式作用元件。马钱子碱能抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化,并能抑制 p65 的进核。结论:马钱子碱抑制 NF- $\kappa$ B 的激活,进而从转录水平 COX-2 的基因表达,促进 A549 细胞凋亡。

**[关键词]** 马钱子碱;非小细胞肺癌细胞 A549;环氧化酶 2;NF- $\kappa$ B

马钱子为马钱属植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的成熟种子,其毒性较强。马钱子具有消肿散结、通络止痛功效,中医传统上主要用来治疗风湿顽痹、跌打损伤、痈疽肿痛等。其主要成分为吲哚型生物碱,包括马钱子碱(brucine)、土的宁(strychnine)、番木鳖次碱(vomicine)、伪番木鳖碱(pseudostrychnine)、伪马钱子碱(pseudobrucine)、可鲁勃林(columbrine)等,这些马钱子生物碱既是其毒性成分,同时也是有效成分。现代药理学研究表明,马钱子生物碱具有多种药理效应,如镇痛、抗炎、抗菌、抑制中枢神经系统、抑制血小板聚集与抗血栓。此外,作者前期研究发现马钱子生物碱具有明显的抗肿瘤活性,其中马钱子碱能抑制肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 与 SMMC7221 的增殖,并促进细胞凋亡,其分子机制在于激活细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平,降低线粒体膜电位,诱导线粒体释放 caspase 水解酶,从而引起肿瘤细胞株通过线粒体途径的细胞凋亡<sup>[1-2]</sup>。

肿瘤是一类严重威胁人类生命与健康的疾病,近年来,由于环境的恶化和人类生活方式的转变,肿瘤的疾病谱发生了很大的变化,在城市肿瘤患者中,肺癌已经成为死亡率最高的恶性肿瘤之一。临床上,肺癌通常分为小细胞与非小细胞肺癌 2 种类型,其中,非小细胞肺癌(包括肺鳞癌,肺腺癌)约占 80%。因此,针对非小细胞肺癌的治疗研究是攻克肺癌的一项极其重要的课题,并引起了全世界医学界的广泛关注。作者在前期研究中发现,马钱子碱能通过抑制 COX-2 的活性增强非小细胞肺癌细胞的凋亡<sup>[3-4]</sup>。COX-2 的表达受转录、转录后、翻译与翻译后等多种水平的精细调节,本研究通过重点考察马钱子碱对 COX-2 的转录水平调节机制,发现马钱子碱能通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性而抑制了 COX-2 的转录激活,从而在分子水平上进一步揭示了马钱子碱抗肿瘤的细胞毒性机制。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** DMEM 细胞培养液购自美国 Hyclone 公司,马钱子碱购自德国 Carl Roth GmbH 公司,纯度大于 97%,加适量稀盐酸使其恰好溶于 DMEM 培养液中备用(pH 7.2~7.4)。细菌脂多糖 LPS 购自美国 Sigma 公司。PCR 扩增引物由深圳华大基因公司合成,荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司,PVDF 转印膜购自 Millipore 公司,鼠抗人 COX-2 单抗购自 Santa Cruz 公司,HRP

**[稿件编号]** 20110810006

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073147);国家民委自然科学基金项目(MZY09003);国家科技部“十二五”科技支撑计划项目(2012BAI27B06)

**[通信作者]** \* 邓旭坤,博士,副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤药理学和中药炮制学研究,Tel:(027) 67841150,E-mail: dxk990720@163.com

**[作者简介]** 朱国民,副主任医师,主要从事生化医学、药理学检验等研究,Tel:(027)67841150



标记的兔二抗购自 Sigma 公司。FITC 标记 Annexin V 购自美国 BD 公司,蛋白质免疫印迹发光检测试剂盒购自英国 Amersham Pharmacia 公司,细胞转染试剂 lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** A549 肺癌细胞株购自 ATCC 细胞库,于 DMEM + 10% 胎牛血清培养液中培养,培养条件为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的湿润无菌环境。细胞长至 80% ~ 90% 融合时,0.25% 胰酶消化。按细胞量  $5 \times 10^3$  个/孔或  $6 \times 10^4$  个/孔分别接种于 96 孔或 24 孔细胞培养板中。

**2.2 COX-2 启动子变体及 COX-2 mRNA 3'-UTR 的构建** 人源 COX-2 启动子(-942/+51)报告质粒由澳大利亚 James Michael 教授惠赠<sup>[5]</sup>。在此质粒基础上,通过 PCR 法构建若干启动子缺失突变体。所用引物如下<sup>[6]</sup>:(-528/+71 sense 5'-tgtGGTACCTTACTCGCCCCAGTCTGTC-3', antisense 5'-tatCTC-GAGCGAGGCGTGCTGAGGAG-3'; -391/+71 sense 5'-tgtGGTACCCAAGTGTCTTCTGCCCTC-3', antisense 5'-tatCTCGAGCGAGGCGTGCTGAGGAG-3'; -262/+71 sense 5'-tgtGGTACCTGGAAGTCCGGG-GAGGAGAG-3'; -210/+71 sense 5'-tgtGGTACCT-GGAAGTCCGGGAGGAGAG-3', antisense 5'-tatCTC-GAGCGAGGCGTGCTGAGGAG-3'; -210/+61 sense 5'-tgtGGTACCTCTGCTCCCAAATTGGGG-3', antisense 5'-tatCTCGAGCGAGGCGTGCTGAGGAG-3'; -121/+71 sense 5'-gtgGGTACCTTTTTTAAGGG-GAGAGGAGG-3', antisense 5'-tatCTCGAGCGAG-GCGTGCTGAGGAG-3'; -51/+71 sense 5'-tgtGG-TACCATGGCTTGGTTTTTCACTC-3', antisense 5'-tatCTCGAGCGAGGCGTGCTGAGGAG-3')。引物两端包括 *Kpn I* 和 *Xho I* 的酶切位点,经过双酶切后,插入至 pGL3-basic vector 质粒中,构建 6 个亚克隆的报告基因质粒,测序结果正确。构建 COX-2 mRNA 3'-UTR 的引物为 sense: cagTCTAGACGTTCGACTGAACTGTAGAAGTC, antisense cag TCTA-GAGGCACATTCAGGCTAATGAGACA。克隆成功后,插入 pGL3-basic 载体上 *Xba I* 位点,筛选正方向阳性重组子,测序结果正确。

**2.3 蛋白质转移印迹法** A549 细胞( $1 \times 10^6$ )经不同浓度马钱子碱(0, 25, 50 mmol · L<sup>-1</sup>)处理 36 h 后胰酶消化、收集细胞,加入细胞裂解液于冰上进行

裂解、离心、收集细胞裂解液,Bradford 方法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后于 10% SDS-PAGE 胶进行电泳分离,分离后蛋白采用半干半湿法转移至 PVDF 膜。转膜完毕后,将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液中进行膜封闭,包被鼠抗人 COX-2 一抗(1:500),二抗包被 HRP 结合的兔二抗(1:1 000)。膜加入适量发光液后,于暗室曝光,X 片于定影液中定影,GAPDH 用作内标检测蛋白总上样量。

**2.4 细胞核蛋白提取** A549 细胞经药物处理后,收集细胞,PBS 洗 2 次,加入 150 μL 细胞裂解 buffer A(10 mmol · L<sup>-1</sup> HEPES, 1.5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> PMSF, 0.06% ~ 0.1% NP-40)破裂细胞膜,冰上放置 15 min 后,800 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,吸取离心上清为细胞质成分。沉淀用 buffer A 再洗 2 次,800 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,然后加入细胞裂解液裂解 30 min,12 000 r · min<sup>-1</sup> 再离心 5 min,收集上清为细胞核抽提物。Tubulin, lamin B 分别作为区分细胞质、细胞核特有蛋白的蛋白质内标。

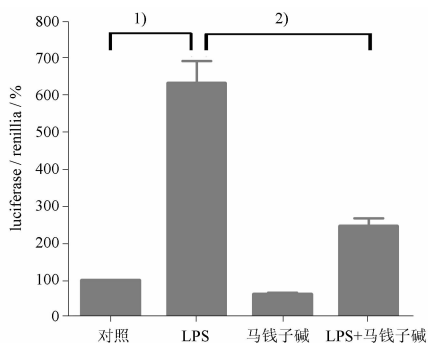
**2.5 荧光素酶报告基因检测** 将构建有 COX-2 启动子的荧光素酶(luciferase)报告质粒与 Renillia 质粒采用 lipofectamine 2000 共转染至 A549 细胞中,药物处理后,收集细胞裂解,上清采用双荧光素酶方法先后测定荧光素酶与 Renillia 的活性,启动子转录活性表示为荧光素酶/Renillia。

**2.6 统计处理** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 10.0 统计软件,多组比较进行单因素方差分析,两两比较进行 Student's-t 检验。

## 3 结果

**3.1 马钱子碱抑制 COX-2 的表达发生在转录水平** 在前期工作基础上已经发现马钱子碱能通过抑制 COX-2 的蛋白与 mRNA 表达水平,诱导细胞凋亡。mRNA 表达水平的调控发生于诸多环节,包括转录水平调节与转录后稳定性调节等多个调节限速步骤。为考察马钱子碱作用 COX-2 转录的具体作用环节,本研究将携带有荧光素酶基因的 COX-2 启动子顺序的报告基因,与 Renillia 共转染至非小细胞肺癌细胞株 A549 中,LPS 为阳性对照。研究结果表明,单用 LPS 刺激 COX-2 启动子的转录活性(与对照组相比  $P < 0.001$ ),但马钱子碱(50 mmol · L<sup>-1</sup>)能显著抑制 LPS 刺激的 COX-2 启动子的转录激活(与对照组相比  $P < 0.01$ ,图 1)。此外,马钱子碱也

能抑制 COX-2 的基础水平。



与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.001$  (图 2 同); 与 LPS + 马钱子碱组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 1 马钱子碱(50 mmol · L<sup>-1</sup>)抑制 LPS 诱导的环氧合酶 COX-2 的转录

Fig. 1 Brucine at 50 mmol · L<sup>-1</sup> suppressed LPS-induced COX-2 transcriptional activation

为了进一步验证该结论,本研究克隆了 COX-2 的 3'-UTR 序列,构建于 PGL<sub>3</sub>-BASIC 质粒。结果表明,LPS 处理显著增强了 COX-2 mRNA 3'-UTR 的稳定性( $P < 0.001$ ,图 2)。在马钱子碱(50 mmol · L<sup>-1</sup>)处理情况下,COX-2 的 3'-UTR 活性与 LPS 组相比并没有明显的改变,表明马钱子碱可能并没有通过作用于 COX-2 的 3'-UTR 而影响 COX-2 mRNA 水平。由以上结果可知,马钱子碱抑制 COX-2 发生在转录水平,而非转录后水平。

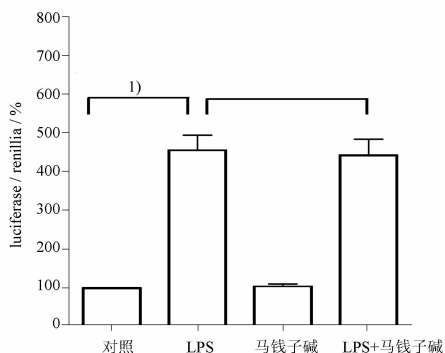
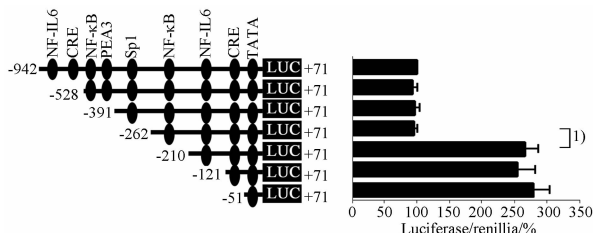


图 2 马钱子碱(50 mmol · L<sup>-1</sup>)对 LPS 稳定环氧合酶 COX-2 3'-UTR 的作用

Fig. 2 Effect of brucine at 50 mmol · L<sup>-1</sup> on COX-2 3'-UTR stability after LPS treatment

### 3.2 NF-κB 是马钱子碱抑制 COX-2 启动子活性的

重要顺式作用元件 为进一步鉴定马钱子碱作用于 COX-2 启动子的顺式作用元件,本研究参照文献方法,根据 COX-2 启动子上潜在的转录因子结合位点,构建了若干个转录因子作用元件的缺失突变体,研究马钱子碱在 COX-2 启动子上敏感性作用元件。研究表明,当 COX-2 启动子缺失 -262 至 +71 位的 NF-κB 转录因子时,马钱子碱(50 mmol · L<sup>-1</sup>)对 COX-2 启动子的抑制作用较大缓解,表明该 NF-κB 可能是马钱子碱抑制 COX-2 启动子活性的重要顺式作用元件。值得注意的是,COX-2 启动子上游区域 -528 至 -391 处仍包括另一 NF-κB 转录因子,但结果表明,马钱子碱对该 NF-κB 转录因子缺失的启动子(-391/+71)转录激活并没有明显的缓解作用,因此该 NF-κB 转录因子结合位点并未参与马钱子碱对 COX-2 的转录抑制作用(图 3)。



-262/+71 与 -210/+71 组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.001$ 。

图 3 启动子消减法研究 COX-2 启动子对马钱子碱敏感的顺式调控元件

Fig. 3 Identification of brucine-responsive cis-elements within COX-2 promoter by sequential deletion analysis

### 3.3 马钱子碱抑制 NF-κB 转录因子的激活

NF-κB 转录因子的激活需要 IκB 的磷酸化解离,而后 NF-κB(p65)暴露核定位信号(NLS),进核结合于诸多受该转录因子调控的下游基因的启动子上,如 COX-2, TNF-α 等,从而启动这些基因的表达。本研究采用蛋白质免疫印迹法考察马钱子碱对 IκB 磷酸化的影响,结果表明马钱子碱能剂量依赖性地抑制 IκBα 的磷酸化(图 4)。抽提细胞核与胞浆裂解液, tubulin 与 lamin B 分别作为胞浆与胞核蛋白的 marker,结果表明,单用 LPS 刺激后, NF-κB 活化进核,蛋白质丰度明显增强。但马钱子碱与 LPS 合用后,很明显地抑制了 LPS 诱导的 NF-κB 进核,同时,马钱子碱也明显地抑制细胞核内本低水平的 NF-κB(图 5),表明 NF-κB 可能是马钱子碱作用于非小细胞肺癌细胞的作用靶点。

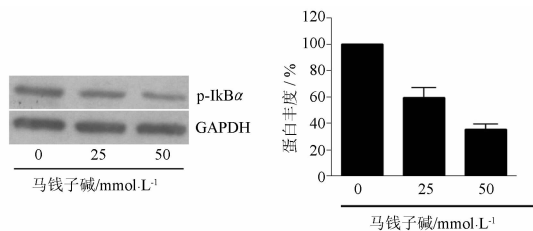


图 4 马钱子碱抑制 IκBα 的磷酸化

Fig. 4 Brucine suppressed the phosphorylation of IκBα

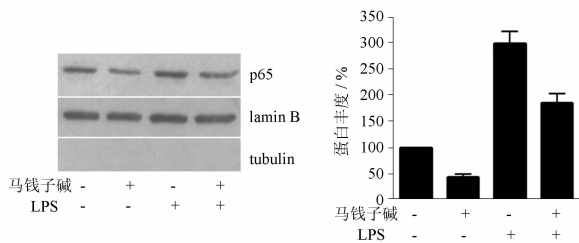


图 5 马钱子碱抑制 LPS 刺激的 NF-κB(p65) 的进核

Fig. 5 Brucine suppressed LPS-induced nuclear translocation of NF-κB

#### 4 讨论

马钱子碱是马钱子中发挥抗炎、抗肿瘤作用的重要吲哚类生物碱成分,文献表明马钱子碱对多种肿瘤细胞具有明显的细胞毒性作用。目前关于马碱子生物碱抗肿瘤作用涉及多种作用机制,如胞内 Ca<sup>2+</sup> 释放与 caspase-3 的激活,其中对 COX-2 的抑制作用是重要机制之一<sup>[7-8]</sup>。很多肿瘤均表现为瘤内细胞 COX-2 高表达,最典型的为结肠癌,事实上,目前针对 COX-2 开发的抑制剂,即常见的非甾体类抗炎药(NSAIDs)均有不同程度的抗肿瘤作用,且已经有 COX-2 抑制剂在国外进行抗肿瘤的临床研究<sup>[1-2]</sup>。本研究进一步证实了抑制 COX-2 在抗非小细胞肺癌上的应用价值,同时深入研究马钱子碱对 COX-2 的抑制作用机制。结果表明马钱子碱通过抑制 NF-κB 的活性,从而抑制 COX-2 的转录水平,而与 COX-2 mRNA 稳定性无明显关系。除了抗肿瘤作用外,马钱子碱也有较强的抗炎作用,其主要机制与抑制炎症组织中炎症介质如 PGE<sub>2</sub> 的释放有关<sup>[9]</sup>。NF-κB 的转录激活与肿瘤细胞的生长有密切关系,涉及到多个环节,如 IκBα 的磷酸化,NF-κB 的泛素化降解,众多与 NF-κB 具有相互作用蛋白影响 NF-κB 的进出核等<sup>[10]</sup>。本研究发现马钱子碱还能显著

性抑制 LPS 诱导的 NF-κB 的激活,表明 NF-κB 很可能是马钱子碱发挥抗炎、抗肿瘤的共同作用机制。本研究初步表明马钱子碱可能通过抑制 IκB 的磷酸化,从而抑制 IκB 与 NF-κB 的解离达到抑制 NF-κB 进核激活 COX-2 的转录作用。

IκB 的磷酸化水平受多种细胞信号路径调控,如 MAPK, PI<sub>3</sub> 等多种激酶。在该复杂的调控网络中,马钱子碱通过何种信号传导途径导致 IκB 磷酸化受阻是下一步要重点解决的问题。综上所述,本研究首次揭示了马钱子碱通过抑制非小细胞肺癌细胞 A549 的 NF-κB 而使 COX-2 的转录激活发生减弱,从而诱导 A549 细胞发生凋亡的作用机制,这为进一步深入研究吲哚类生物碱成分在抗肿瘤中的应用价值提供了参考。

#### [参考文献]

- [1] Deng X K, Yin W, Li W D, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006,106: 179.
- [2] Deng X, Yin F, Lu X, et al. The apoptotic effect of brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* on human hepatoma cells is mediated via Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> involved mitochondrial pathway[J]. *Toxicol Sci*, 2006,91: 59.
- [3] Yin W, Deng X K, Yin F Z, et al. The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2007,45: 1700.
- [4] 朱国民,殷放宙,邓旭坤,等. 马钱子碱抑制非小细胞肺癌细胞环氧化酶 2 表达的研究[J]. *中国癌症杂志*, 2009,19(9): 671.
- [5] Cook-Johnson R J, Demasi M, Cleland L G, et al. Endothelial cell COX-2 expression and activity in hypoxia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006,1761: 1443.
- [6] Feng S, Chen W, Cao D, et al. Involvement of Na( + ), K( + )-ATPase and its inhibitors in HuR-mediated cytokine mRNA stabilization in lung epithelial cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 109.
- [7] Brown J R, DuBois R N. Cyclooxygenase as a target in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10: 4266.
- [8] Brown J R, DuBois R N. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention[J]. *J Clin Oncol*, 2005,23: 2840.
- [9] Yin W, Wang T S, Yin F Z, et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003,88: 205.
- [10] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF-κB in development and progression of human cancer[J]. *Virchows Arch*, 2005, 446: 475.



## Effect of NF- $\kappa$ B on inhibition of non-small cell lung cancer cell cyclooxygenase-2 by brucine

ZHU Guomin<sup>1,2</sup>, YIN Fangzhou<sup>3</sup>, DENG Xukun<sup>2\*</sup>

1. Department of Medical Examination, Gaochun Hospital of Nanjing, Nanjing 211300, China;
2. College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;
3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the molecular mechanism of cyclooxygenase-2 (COX-2), one of effective ingredient of brucine, in inducing non-small cell lung cancer cell apoptosis. **Method:** COX-2 promoter, transcription factor deletion mutants and COX-2 mRNA 3'-UTR-containing report plasmids were transfected with Renillia to non-small cell lung cancer A549 cell, in order to detect the activity of report gene luciferase and minimum cis-acting element of COX-2 promoter inhibited by brucine. The influence of brucine on I $\kappa$ B phosphorylation and the nuclear translocation of p65 were detected by immunoblotting assay. **Result:** Brucine significantly suppressed LPS-induced COX-2 promoter activation, but revealed minor impact on COX-2 mRNA stability. NF- $\kappa$ B in the vicinity of COX-2 promoter-262 was an important cis-acting element of brucine for inhibiting the activity of COX-2 promoter. Brucine was found to inhibit the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  as well as the nuclear translocation of p65. **Conclusion:** Brucine can improve A549 cells apoptosis by inhibiting the activity of NF- $\kappa$ B and the subsequent COX-2 gene expression.

[**Key words**] brucine; non-small-cell lung cancer cell (NSCLC) A549; cyclooxygenase 2; NF- $\kappa$ B

doi:10.4268/cjmm20120921

[责任编辑 张宁宁]