

NF- κ B 荧光素酶报告基因系统的构建及验证

郭志兰^{1,2}, 车路阳³, 李晶哲², 孙震晓¹, 刘长振²

1 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

2 中国中医科学院 医学实验中心 北京市重点实验室, 北京 100700

3 中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853

郭志兰, 车路阳, 李晶哲, 等. NF- κ B 荧光素酶报告基因系统的构建及验证. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1465–1473.

Guo ZL, Che LY, Li JZ, et al. Construction and verification of NF- κ B luciferase reporter gene system. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1465–1473.

摘要: 为了定量检测 NF- κ B 的活化效果及筛选与 NF- κ B 活化调控相关的药物, 通过去除逆转录病毒载体 pQCXIP 原有的 CMV 启动子, 并分别插入 NF- κ B 增强子序列及荧光素酶 NanoLuc 报告基因序列, 构建了一种新的含有 NF- κ B 增强子序列和 NanoLuc (NLuc) 报告基因序列的表达载体, 并进一步建立受 NF- κ B 调控的稳定表达 NLuc 荧光素酶的细胞系。酶切鉴定及测序结果表明成功构建了重组质粒 pQCXIP-NF- κ B-NLuc; NF- κ B 信号通路的刺激物肿瘤坏死因子 TNF- α 作用于构建的稳定表达 NLuc 的细胞系后出现特异性的荧光素酶反应, 且该酶反应与 TNF- α 的刺激呈良好的时间、剂量依赖性, 该结果表明受 NF- κ B 调控的稳定表达 NLuc 荧光素酶的细胞系构建成功。实例验证中, NF- κ B 抑制剂雷公藤甲素对此细胞系 NLuc 荧光素酶表达的抑制呈剂量效应。综上, 本实验构建的受 NF- κ B 调控的稳定表达 NLuc 荧光素酶的报告基因系统可用于 NF- κ B 的活化效果的定量检测及筛选与 NF- κ B 活化调控相关的药物, 具有研究和应用价值。

关键词: NF- κ B, 荧光素酶 NanoLuc, 报告基因系统

Received: May 5, 2016; **Accepted:** June 20, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31170829, 81171762, 81550017, 81473418), Research Project of CACMS (No. zz2015015).

Corresponding authors: Changzhen Liu. Tel: +86-10-64089526; E-mail: lcz0220@163.com

Zhenxiao Sun. Tel: +86-10-84738646; E-mail: sunzxncn@hotmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 31170829, 81171762, 81550017, 81473418), 中国中医科学院自主选题项目 (No. zz2015015) 资助。

Construction and verification of NF- κ B luciferase reporter gene system

Zhilan Guo^{1,2}, Luyang Che³, Jingzhe Li², Zhenxiao Sun¹, and Changzhen Liu²

1 College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2 Beijing Key Laboratory of Research of Chinese Medicine on Prevention and Treatment for Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3 Department of Orthopedics, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract: To quantify the transcriptional activity of NF- κ B and to screen drugs related to the regulation of NF- κ B activation, we constructed a recombinant plasmid through deleting the original CMV promoter of retrovirus vector pQCXIP and inserting the NF- κ B enhancer and NanoLuc luciferase sequence into the vector. Then, using the recombinant plasmid we constructed a cell line in which the expression of NanoLuc luciferase (NLuc) was regulated by NF- κ B. The inserted sequences were verified by restriction endonuclease digestion and sequencing. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), an NF- κ B activator, acted on the constructed NLuc cell line and led to the specific luciferase reaction. The luciferase reaction showed a fine time and dose dependence to the TNF- α stimulation, indicating the successful construction of the NF- κ B regulated NLuc-expressing cell line. Besides, the NF- κ B inhibitor, triptolide, reduced the expression of NLuc in a dose-dependent way. The constructed reporter system in this study could be applied in the quantification of the NF- κ B transcriptional activity and in the NF- κ B regulation-related drug screening.

Keywords: NF- κ B, NanoLuc luciferase, reporter gene system

NF- κ B (Nuclear factor- κ B) 作为一种核转录因子能够与多种基因启动子区的特定核苷酸序列结合从而启动下游基因转录, 在免疫、炎症、氧化应激、细胞增殖与凋亡等生理病理过程中起重要调控作用^[1]。NF- κ B 蛋白家族包括 p50、p52、p65 (RelA)、RelB、c-Rel 五个亚基, 其功能状态通常为这些亚基形成的同源或异源二聚体, 其中最常见的是 NF- κ B 二聚体为 p65 与 p50 组成的异二聚体。在胞浆中, 这些 NF- κ B 二聚体常常以与 I κ B 结合的形式存在, 处于非活性状态, 在上游信号促使 I κ B 降解后进入细胞核参与下游基因的表达调控。另外胞浆中还存在着一些非活性的 NF- κ B 前体蛋白二聚体。这些前体蛋白通过非经典途径剪切成相应具有活性的 NF- κ B 二聚体, 进而入核参与下游基因的表

达调控^[2-3]。研究表明, 人体许多疾病如阿尔兹海默症、糖尿病、风湿性关节炎、哮喘及一些癌症等均与 NF- κ B 的失调相关^[4-10], 因此, NF- κ B 蛋白家族及其在人类疾病的发生发展与预防治疗中所扮演的角色等一直是研究的热点。

报告基因 (Reporter gene) 是一种编码易于被检测的蛋白质或酶的基因。该基因序列可以插入到基因表达调节序列 (如启动子、增强子) 之后形成嵌合基因, 或与其他目的基因序列相连接形成融合蛋白的基因序列, 进而通过检测该报告基因的表达来定性或定量测定目的基因的表达情况。常用的报告基因有氯霉素转乙酰酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶以及荧光蛋白等^[11]。本实验室选用的 NanoLuc (NLuc) 是一种人工改造的荧光素酶, 其分子量小 (19.1 kDa, 171

个氨基酸), 热稳定性高, 没有翻译后修饰或二硫键; 其发光强度与萤火虫荧光素酶或海肾荧光素酶相比强 100 倍, 且其反应不依赖 ATP^[12]。这些优点使得 NLuc 成为目前较理想的报告基因之一。

本实验室期望通过对现有逆转录病毒载体的改造 构建一种新的含有 NF- κ B 增强子序列和 NLuc 报告基因序列的表达载体, 并进一步构建受 NF- κ B 调控的稳定表达 NLuc 荧光素酶的细胞系。该细胞系可被用于 NF- κ B 活化状态定量检测和与 NF- κ B 活化调控相关的药物的筛选之中。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒

感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 人胚肾上皮包装细胞 GP2-293、人宫颈癌细胞系 HeLa 由本实验室保存; pQCXIP 载体购自 Clontech 公司; NF- κ B 增强子序列、NLuc 序列及 TATA box 序列由北京普尔普乐生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、连接酶购自 Fermentas 公司; 肿瘤坏死因子 TNF- α 购自 Peprotech 公司; 雷公藤甲素 (Triptolide) 购自南通飞宇生物科技有限公司; 腔肠素购自 Sigma 公司; 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自天根

生化科技 (北京) 有限公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司、胎牛血清购自 HyClone 公司。

1.2 方法

1.2.1 逆转录病毒载体 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 的构建及其鉴定

逆转录病毒载体 pQCXIP 原有 CMV 启动子的去除、NF- κ B 增强子和 TATA box 序列的装入, 以及荧光素酶 NLuc 基因序列的装入如图 1 所示。首先将 pQCXIP 利用 *Bgl* II、*Age* I 进行双酶切, 去除 pQCXIP 原有 CMV 启动子, 然后将合成的含有转录因子 NF- κ B 增强子和 TATA box 序列 (序列如表 1 所示 两端含有 *Bgl* II 和 *Age* I 的酶切位点) 的 DNA 片段经 *Bgl* II、*Age* I 双酶切装载入改造后的 pQCXIP 质粒上。NanoLuc (序列如表 1 所示, 两端含有 *Age* I 和 *EcoR* I 的酶切位点) 与上述得到的 pQCXIP-NF- κ B 质粒分别用 *Age* I、*EcoR* I 进行双酶切, 连接并转化获得重组的逆转录病毒载体 pQCXIP-NF- κ B-NLuc。本实验合成的 NanoLuc 序列的 N 端部分含有分泌信号肽, 可帮助蛋白分泌到细胞外的培养基中。同时, 我们构建了去除 NF- κ B 增强子 (保留 TATA box) 的质粒 pQCXIP-TATA-NLuc 作为对照载体。构建的质粒经华大基因测序表明序列正确。

1.2.2 质粒转染与病毒制备

人胚肾上皮包装细胞 GP2-293 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条

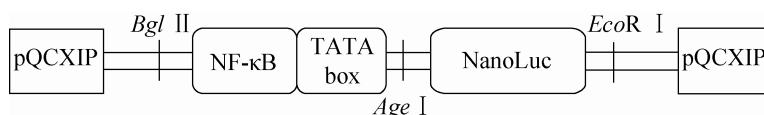


图 1 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 的构建示意图

Fig. 1 Schematic representation of the construction of pQCXIP-NF- κ B-NLuc plasmid.

表 1 NF- κ B-TATA box 和 NanoLuc 序列Table 1 Sequence of NF- κ B-TATA box and NanoLuc

Sequence name	Size (bp)	Sequence
NF- κ B-TATA box	1	AGATCTGGGA ATTTCCGGGA ATTTCCGGGA ATTTCCGGGA ATTTCCCTTAA
	51	TTAAAGACTC TAGAGGGTAT ATAATGGAGC CAATGACAAG ACGCTGGGCG
	101	GGGTTTGTGT CATCATAGAA CTAAAGACAT GCAAATATAT TTCTTCCGGG
	151	GACACCGCCA GCAAACGCGA GCAACGGGCC ACGGGGATGA AGCAGCGAAG
	201	AAATCTGCAC TCGACGGTAG CGCGGGACCG GCATCCACCG GT
NanoLuc	1	ACCGGTCGCC ACCATGAACT CCTTCTCCAC AAGCGCCTTC GGTCCAGTTG
	51	CCTTCTCCCT GGGCCTGCTC CTGGTGTTC CTGCTGCCTT CCCTGCCCCA
	101	GTCTTCACAC TCGAAGATTT CGTTGGGGAC TGGCGACAGA CAGCCGGCTA
	151	CAACCTGGAC CAAGTCCTTG AACAGGGAGG TGTGTCCAGT TTGTTTCAGA
	201	ATCTCGGGGT GTCCGTA ACT CCGATCCAAA GGATTGTCCT GAGCGGTGAA
	251	AATGGGCTGA AGATCGACAT CCATGTCATC ATCCCGTATG AAGGTCTGAG
	301	CGGCGACCAA ATGGGCCAGA TCGAAAAAAT TTTTAAGGTG GTGTACCCTG
	351	TGGATGATCA TCACTTTAAG GTGATCCTGC ACTATGGCAC ACTGGTAATC
	401	GACGGGGTTA CGCCGAACAT GATCGACTAT TTCGGACGGC CGTATGAAGG
	451	CATCGCCGTG TTCGACGGCA AAAAGATCAC TGTAACAGGG ACCCTGTGGA
	501	ACGGCAACAA AATTATCGAC GAGCGCCTGA TCAACCCCGA CGGCTCCCTG
	551	CTGTTCCGAG TAACCATCAA CGGAGTGACC GGCTGGCGGC TGTGCGAACG
	601	CATTCTGGCG TAAGCCGCG ACTCTAGAGT CGGGGCGGCC GGCCGCTTCG
	651	AGCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA
	701	TGCAGTGGAA TTC

件下培养、传代。构建的 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 质粒及对照质粒 pQCXIP-TATA-NLuc 与 pVSV-G 病毒包装质粒利用 Lipofectamine 2000 转染试剂按操作说明共转染入 GP2-293 细胞，其中质粒与 Lipofectamine 2000 质量体积比在预实验后选用转染效果较好的 1:2。转染 5 h 后培养基更换成新鲜 DMEM+10% FBS 完全培养基继续培养，48 h 后收集含病毒上清，经 0.45 μ m 滤膜过滤，分装。

1.2.3 病毒侵染

人宫颈癌细胞 HeLa 以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中，在 DMEM+10% FBS 培养基，37 $^{\circ}$ C、5%

CO₂ 条件下培养。24 h 后，将上述制备的含病毒上清 1 mL 与 2 mL 新鲜完全培养基及 polybrene (8 μ g/mL) 加至 HeLa 细胞，并于 32 $^{\circ}$ C、1 800 \times g (Beckman Allegra X15R) 水平离心机中离心 90 min，37 $^{\circ}$ C 静置 5 h，再更换成新鲜 DMEM+10% FBS 培养基继续培养。

1.2.4 稳定表达单克隆的筛选

病毒侵染 48 h 后，HeLa 细胞中加入 3 μ g/mL 嘌呤霉素 (Puromycin) 进行筛选。24 h 后将嘌呤霉素浓度降低到 1 μ g/mL 维持抗性。4 d 后，将存活细胞计数并按 1 个细胞/孔分配至 96 孔板中。两周后，将其中的单克隆细胞株继续放

大培养。所获得的细胞株记为 PP-NF- κ B-NLuc-HeLa 以及 PP-TATA-NLuc-HeLa。

1.2.5 稳定表达细胞系有效性验证

将上述获得的稳定表达细胞分别进行细胞计数,以 2×10^4 /孔加入 96 孔板中。24 h 后加入 NF- κ B 信号通路的刺激物肿瘤坏死因子 TNF- α , 浓度分别为 0、5 和 10 ng/mL, 每组设 5 个复孔。加药 24 h 后, 取培养基上清, 加入 $3 \mu\text{mol/L}$ 底物腔肠素 (Coelenterazine), 使用化学发光仪 (BioTek Synergy 2) 检测发光值。此外, 针对 PP-NF- κ B-NLuc-HeLa 细胞系进行了 0.1、0.5 和 2.5 ng/mL 三个浓度的 TNF- α 分别刺激 3、6、9、12 和 24 h 的效果检测。

1.2.6 阳性药物雷公藤甲素的抑制

稳定表达的 PP-NF- κ B-NLuc-HeLa 细胞系计数, 以 2×10^4 /孔加入 96 孔板中。24 h 后加入 2.5 ng/mL TNF- α (除空白组) 刺激 8 h, 再分别加入 0、0.25、1、4 ng/mL 雷公藤甲素共刺激 12 h, 取培养基上清检测发光值。

2 结果与分析

2.1 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 质粒的构建

理论上逆转录病毒载体 pQCXIP 的 CMV 启动子部分的长度为 (680 bp)。在本研究中, pQCXIP 经 *Bgl* II、*Age* I 双酶切后, 琼脂糖电泳结果表明 (图 2A), 680 bp 位置处出现一条明显的核酸条带, 而其上的核酸条带位置与理论去除 CMV 启动子部分的 pQCXIP 位置 (6.5 kb) 相近, 因此可以判断获得了去除 CMV 启动子的逆转录病毒载体 pQCXIP。接下来我们将 *Bgl* II、*Age* I 双酶切后的 NF- κ B 增强子/TATA box 序列与改造的 pQCXIP 进行连接和转化。利用 *Bgl* II、*Age* I 双酶切鉴定表明 (图 2B), 双酶切得到的核酸条带与理论插入的 NF- κ B 增强子/TATA box 序列条带 (242 bp) 大小吻合, 说明已构建获得重组质粒 pQCXIP-NF- κ B。随后将 NLuc 与重组质粒 pQCXIP-NF- κ B 经 *Age* I、*Eco*R I 双酶切、连接和转化, 并经 *Bgl* II、*Eco*R I 双酶切鉴定

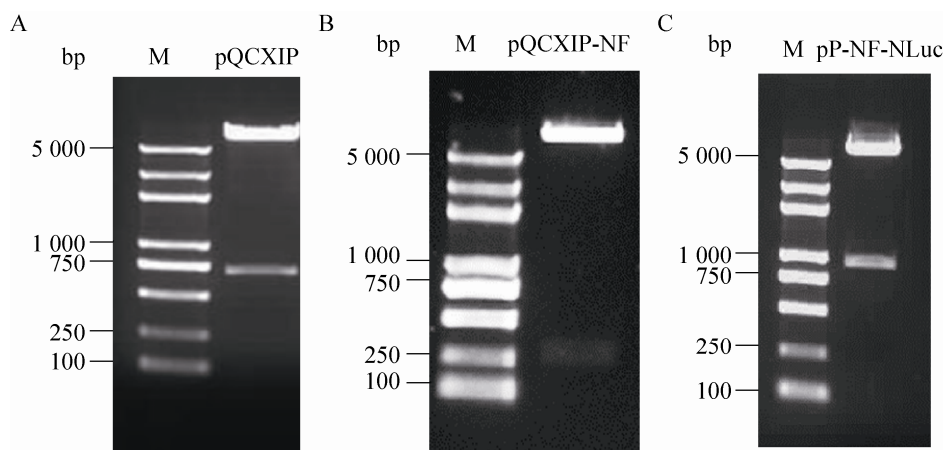


图 2 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 重组质粒的构建及鉴定

Fig. 2 Construction and identification of the recombinant plasmid pQCXIP-NF- κ B-NLuc. (A) *Bgl* II, *Age* I digestion result of pQCXIP plasmid. (B) Identification of recombinant plasmid pQCXIP-NF- κ B digested by *Bgl* II, *Age* I. (C) Identification of recombinant plasmid pQCXIP-NF- κ B-NLuc digested by *Bgl* II, *Eco*R I.

(图 2C), 结果表明 NLuc 序列被成功插入 pQCXIP-NF- κ B 中, 获得了目标质粒 pQCXIP-NF- κ B-NLuc。该质粒经测序证明序列完全正确。

2.2 NF- κ B-NLuc 稳定表达细胞系的构建

随后, 将构建的 pQCXIP-NF- κ B-NLuc 质粒与 pVSV-G 病毒包装质粒共转染 GP2-293 细胞获得逆转录病毒, 并将该病毒侵染 HeLa 细胞。经过嘌呤霉素筛选及单克隆分离, 成功地获得了 NF- κ B-NLuc 单克隆稳定表达细胞系。按同样方案也成功地获得了对照组细胞 TATA-NLuc 单克隆稳定表达细胞系。两组细胞系在加入 NF- κ B 信号通路的刺激物 TNF- α 刺激 24 h 后进行了 NLuc 酶活性检测。结果表明 (图 3), 在 5 ng/mL 和 10 ng/mL TNF- α 作用下, NF- κ B-NLuc 组细胞上清中的酶活性上升, 分别为 0 ng/mL TNF- α 组细胞酶活性的 6 和 11 倍, 差异有统计学意义 (* P <0.05 ;** P <0.01)。而在 5 ng/mL 和 10 ng/mL TNF- α 作用下, 对照组 TATA-NLuc 细胞上清中

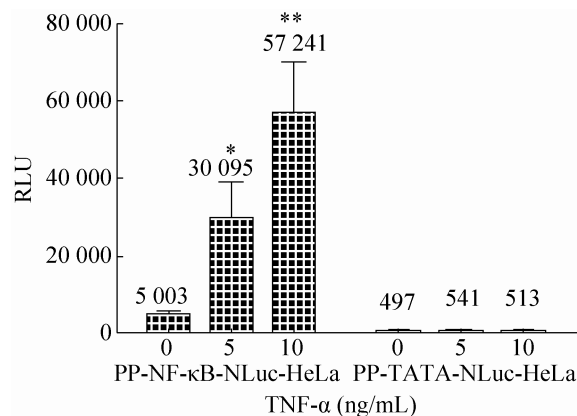


图 3 TNF- α 对 PP-NF- κ B-NLuc-HeLa 及 PP-TATA-NLuc-HeLa 细胞系的刺激作用

Fig. 3 Stimulation of PP-NF- κ B-NLuc-HeLa and PP-TATA-NLuc-HeLa cell lines by NF- κ B activator TNF- α .

的酶活性与 0 ng/mL TNF- α 组细胞酶活性相比无显著差异。此外, NF- κ B-NLuc 组细胞在 0.5 及 2.5 ng/mL 浓度的 TNF- α 刺激不同时间段下呈良好的线性增长趋势 (图 4)。这些结果说明, 我们成功地构建获得针对 NF- κ B 活化检测的 NLuc 荧光素酶报告基因系统。

2.3 NF- κ B 荧光素酶报告基因系统对药物检测能力的验证

进一步尝试利用已知抑制 NF- κ B 活化的药物雷公藤甲素来验证 NF- κ B 荧光素酶报告基因系统对药物的检测能力。CCK-8 检测实验表明 (图 5), 2.5 ng/mL TNF- α 以及 0.25-1 ng/mL 雷公藤甲素都未对细胞活力产生明显影响, 在雷公藤甲素浓度为 4 ng/mL 时仅有少量影响。随后荧光素酶活性检测表明 (图 6), 2.5 ng/mL TNF- α 使得细胞上清的酶活性上升了 4.3 倍, 而加入不同浓度的雷公藤甲素均能抑制 TNF- α 促使的荧光素酶活性增加, 在 4 ng/mL 浓度时对 TNF- α 诱导活化的 NF- κ B 抑制率为 53%, 且抑制作用呈剂量效应。

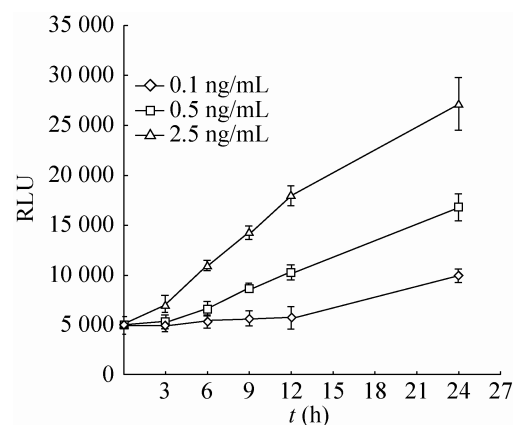


图 4 各种浓度 TNF- α 在不同时间段刺激 PP-NF- κ B-NLuc-HeLa 细胞系的结果

Fig. 4 TNF- α stimulation of PP-NF- κ B-NLuc-HeLa cell line in a dose and time dependent manner.

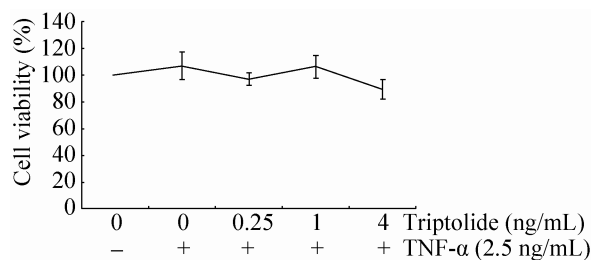


图5 CCK-8法检测TNF- α 与各种浓度雷公藤甲素对细胞活力的影响

Fig. 5 The cell viability after TNF- α and triptolide treatment by CCK-8 test.

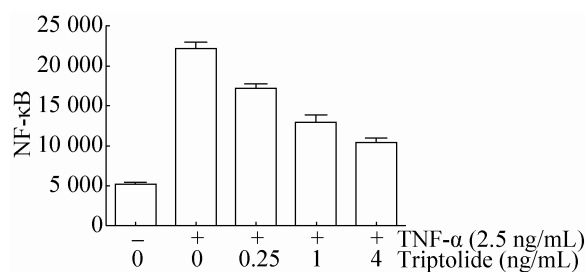


图6 雷公藤甲素抑制TNF- α 诱导的PP-NF- κ B-NLuc-HeLa细胞系中NLuc的表达

Fig. 6 Inhibition of NLuc expression by triptolide in PP-NF- κ B-NLuc-HeLa cell line.

3 讨论

在本研究中,我们通过对逆转录病毒载体pQCXIP的改造,去除了原有的CMV启动子,并且装载入NF- κ B增强子序列和NLuc报告基因序列,成功构建了重组逆转录病毒载体pQCXIP-NF- κ B-NLuc。利用该载体包装获得了逆转录病毒,使其侵染HeLa细胞,再经过药物筛选最终获得了NF- κ B-NLuc稳定表达细胞系。NF- κ B信号通路刺激物TNF- α 和NF- κ B活化抑制药物雷公藤甲素检测构建细胞的荧光素酶活性变化表明,我们成功地构建获得针对NF- κ B活化检测的NLuc荧光素酶报告基因系统。

当前,包括NF- κ B信号通路在内的多种信

号通路报告基因检测系统主要来源于Promega和Invitrogen等商业公司。这些公司提供的相关质粒、病毒所构建的报告基因系统虽然成熟、稳定,但也因其序列固定限制了研究者对构建的报告基因系统的调整和完善,以及在特定情况下的使用。本研究提供了一套可行的针对NF- κ B活化检测的逆转录病毒载体的改造和重组方案,并成功地获得了相应的荧光素酶报告基因系统。研究中对所用的逆转录病毒载体pQCXIP的改造和重组尚无相关报道,具有一定的科研价值。同时本研究中所构建的载体还可根据后续的科研要求对NF- κ B反应元件序列、TATA box序列和报告基因NLuc序列进行自由改造,并可引入其他转录因子的反应元件,因此可为后续科研工作提供研究基础,以及为其他研究者的相关载体改造工作提供一定的借鉴。

在发现了RelA/p65与c-Rel以及它的致癌性衍生物v-Rel之间存在同源性后,NF- κ B与癌症之间存在关联性的设想就被提出^[13]。流行病学研究的大量数据证实了这一设想,并进一步促使研究者们去探究NF- κ B与癌症之间的作用机制。基于NF- κ B与癌症之间的关联性,以NF- κ B及其信号通路为靶标的药物被研制以用于肿瘤的预防与治疗。如DHMEQ(Dehydroxymethylepoxyquinomicin),一种新型的NF- κ B抑制剂,在乳腺癌^[14-15]、肝癌^[16-17]、多发性骨髓瘤^[18]的体内外实验中均展现出较好的抑制肿瘤生长及促凋亡效果,并可有效协同化疗药物或放射疗法起到抗肿瘤的作用^[19-22]。此外,针对NF- κ B设计的一些小分子、单克隆抗体及激动剂等在治疗或预防2型糖尿病、代谢综合征、心血管疾病以及HIV潜伏感染^[23-24]等均取得了一定进展。如上所述,研制和筛选新型NF- κ B信号通路抑制剂在多种重大

疾病的治疗和预防上都具有重要的价值和广阔的应用前景。已有报道表明, NF- κ B-NLuc 报告基因系统是筛选调节 NF- κ B 活性的药物植物单体或提取物的有力的、便捷的工具。Orlando 等^[25]利用 Panomics 公司的 293T/NF- κ B-luc 细胞系对西班牙国家常用的 20 种草药抗炎活性进行了初步判断。Ajit 等^[26]利用 DI TNC1 (永生化大鼠星型胶质瘤细胞)/NF- κ B-luc 细胞系对一系列植物单体或提取物进行了抗炎活性检测。我国中医药文化博大精深, 中药等药物植物资源极为丰富。本研究构建的 NF- κ B-NLuc 报告基因系统在提供了一套可行的针对 NF- κ B 活化检测的载体改造、重组方案的同时, 还可用于快速、高通量地筛选中药资源库, 以便捷的方式获得 NF- κ B 信号通路抑制剂, 因此具有一定的研究和应用价值。

REFERENCES

- [1] Su JD, Wu LF. Relationship between nuclear factor-kappa B and cell apoptosis. *World Chin J Digestol*, 2007, 15(12): 1411–1416 (in Chinese). 苏剑东, 吴灵飞. NF- κ B 与细胞凋亡. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(12): 1411–1416.
- [2] Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6680–6684.
- [3] Razani B, Reichardt AD, Cheng GH. Non-canonical NF- κ B signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev*, 2011, 244(1): 44–54.
- [4] Yang Y, Li JJ, Wang X, et al. Progresses on reporter gene and its application. *Life Sci Res*, 2011, 15(3): 277–282 (in Chinese). 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其应用研究进展. *生命科学研究*, 2011, 15(3): 277–282.
- [5] Gilmore TD. The Rel1/NF- κ B/I κ B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat Res*, 2003, 115: 241–265.
- [6] Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2013, 12(5): 349–361.
- [7] Granic I, Dolga AM, Nijholt IM, et al. Inflammation and NF- κ B in Alzheimer's disease and diabetes. *J Alzheimers Dis*, 2009, 16(4): 809–821.
- [8] Rico-Rosillo G, Vega-Robledo GB. The involvement of NF- κ B transcription factor in asthma. *Rev Alerg M \acute{e} x*, 2011, 58(2): 107–111.
- [9] Zubair A, Frieri M. Role of nuclear factor- κ B in breast and colorectal cancer. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013, 13(1): 44–49.
- [10] Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci*, 2009, 116(6): 451–465.
- [11] Okamoto T. NF- κ B and rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006, 6(4): 359–372.
- [12] Hall MP, Unch J, Binkowski BF, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(11): 1848–1857.
- [13] Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells*, 2016, 5(2): 15.
- [14] Wang W, Nag SA, Zhang RW. Targeting the NF- κ B signaling pathways for breast cancer prevention and therapy. *Curr Med Chem*, 2015, 22(2): 264–289.
- [15] Matsumoto G, Namekawa JI, Muta M, et al. Targeting of nuclear factor κ B pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1287–1293.
- [16] Nishimura D, Ishikawa H, Matsumoto K, et al. DHMEQ, a novel NF- κ B inhibitor, induces apoptosis and cell-cycle arrest in human hepatoma cells. *Int J Oncol*, 2006, 29(3): 713–719.
- [17] Poma P, Notarbartolo M, Labbozzetta M, et al.

- Antitumor effects of the novel NF- κ B inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production. *Int J Oncol*, 2006, 28(4): 923–930.
- [18] Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T, et al. A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 32–38.
- [19] Pushkarev VV, Starenki DV, Pushkarev VM, et al. Inhibitor of the transcription factor NF- κ B, DHMEQ, enhances the effect of paclitaxel on cells of anaplastic thyroid carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Ukr Biochem J*, 2015, 87(3): 63–74.
- [20] Togano T, Nakashima M, Watanabe M, et al. Synergistic effect of 5-azacytidine and NF- κ B inhibitor DHMEQ on apoptosis induction in myeloid leukemia cells. *Oncol Res*, 2012, 20(12): 571–577.
- [21] Kozakai N, Kikuchi E, Hasegawa M, et al. Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer. *Br J Cancer*, 2012, 107(4): 652–657.
- [22] Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(10-12): 775–787.
- [23] Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015, 24(3): 283–307.
- [24] Jiang GC, Dandekar S. Targeting NF- κ B signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2015, 31(1): 4–12.
- [25] Orlando RA, Gonzales AM, Hunsaker LA, et al. Inhibition of nuclear factor κ B activation and cyclooxygenase-2 expression by aqueous extracts of hispanic medicinal herbs. *J Med Food*, 2010, 13(4): 888–895.
- [26] Ajit D, Simonyi A, Li RT, et al. Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in DI TNC1 astrocytes. *Neurochem Int*, 2016, 97: 49–56.

(本文责编 陈宏宇)