

学校编码: 10384

分类号 密级

学号:30520091152238

UDC

廈門大學

硕士学位论文

和厚朴酚抑制 TNF α /Nur77 生存通路的
分子机制

The Molecular Mechanism of Honokiol
Inhibits TNF α /Nur77 Survival Pathway

谢雷

指导教师姓名：曾锦章 教授

张晓坤 教授

专业名称：化学生物学

论文提交日期：2012 年 4 月

论文答辩时间：2012 年 6 月

学位授予日期： 年 月

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2012 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

目 录

摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章 前言.....	3
1. 核受体.....	3
1.1 核受体介绍.....	3
1.2 核受体的结构.....	3
2. 核受体 Nur77 概述.....	4
2.1 孤儿核受体 Nur77 的特性.....	4
2.2 Nur77 促生长功能.....	4
2.3 Nur77 抑制癌细胞增殖作用.....	5
2.4 核受体的基因型效应.....	6
2.5 核受体的非基因型效应.....	8
3. 和厚朴酚简介.....	9
3.1 和厚朴酚的抗菌抗病毒作用.....	10
3.2 和厚朴酚的抗炎症作用.....	10
3.3 和厚朴酚的抗肿瘤作用及机制.....	10
3.4 和厚朴酚与核受体关系的研究.....	11
4. TNF α 及其调控途径.....	11
4.1 TNF α 概述.....	11
4.2 TNF α 调控的凋亡途径.....	12
4.3 TNF α 调控的生存途径.....	13
4.4 TNF α 调控的脂肪酸合成对癌细胞的影响.....	16
5. 炎症因子与癌症.....	16
6. 本文的研究目的及意义.....	18
第二章 材料与amp;方法.....	19
1. 材料.....	19
1.1 细胞株.....	19
1.2 克隆宿主菌.....	19
1.3 主要试剂.....	19
1.4 主要仪器.....	20
1.5 常用缓冲液及其它溶液.....	21
1.5.1 细胞培养相关溶液.....	21
1.5.2 SDS-PAGE 相关溶液.....	21
1.5.3 Western blot 相关溶液.....	22
1.5.4 细菌培养和基因克隆相关溶液.....	23
1.5.5 免疫荧光相关溶液.....	24
1.5.6 琼脂糖电泳相关溶液.....	24
1.5.7 抗生素.....	24

1.5.8 转染相关溶液.....	25
2. 实验方法.....	25
2.1 细胞培养.....	25
2.2 细胞的冻存.....	25
2.3 细胞复苏.....	25
2.4 基因克隆方法.....	25
2.5 细胞转染.....	27
2.5.1 磷酸钙法.....	27
2.5.2 脂质体法.....	27
2.6 RNA 干扰技术.....	28
2.7 蛋白免疫印迹 (Western Blotting) 分析.....	28
2.8 核质分离.....	29
2.9 RT-PCR.....	30
第三章 结果与分析.....	32
1. TNF α 诱导 Nur77 的表达.....	32
2. TNF α 通过 NF- κ B 诱导 Nur77 的表达.....	32
3. TNF α 上调细胞核内 Nur77 蛋白水平.....	33
4. 和厚朴酚下调 TNF α 诱导的 Nur77 蛋白表达.....	34
5. 和厚朴酚调控内、外源 Nur77 蛋白表达的一致性.....	35
6. Nur77 蛋白降解途径.....	36
7. 和厚朴酚抑制 Nur77 对乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的激活作用.....	36
8. 和厚朴酚和 TNF α 协同诱导癌细胞凋亡.....	37
第四章 讨论.....	39
第五章 总结.....	41
参考文献.....	42
致 谢.....	49

Table of Contents

Abstract In Chinese	1
Abstract	2
Chapter I Preface	3
1.Nuclear Reporter	3
1.1 Introduction of Nuclear Reporter	3
1.2 Structure of Nuclear Reporter	3
2. The Summary of nuclear receptor Nur77	4
2.1 The features of orphan nuclear receptor Nur77.....	4
2.2 The functions of promoting growth for Nur77.....	4
2.3 Nur77 inhibites the proliferation of cancer cells	5
2.4 Genomic function of nuclear receptor	6
2.6 Nongenomic function of nuclear receptor	8
3.Introduction of Honokiol	9
3.1 Antibacterial and antiviral action of honokiol.....	10
3.2 Antiinflammatory action of honokiol.....	10
3.3 Antitumor action and mechanisms of honokiol	10
3.4 The research for the relation of honokioland nuclear receptor.....	11
4.TNFα and its regulatory pathway	11
4.1 Introduction of TNF α	11
4.2 TNF α regulates the pathway of apoptosis	12
4.3 TNF α regulates the pathway of survival	13
4.4 The fatty acid synthesis that TNF α regulates effects cancer cells	16
5.Inflammatory factor and cancer	16
6.Aim and scientific significance of this study	18
Chapter II Materials and Methods	19
1. Materials	19
1.1 Cell lines	19
1.2 Cloning host bacterium	19
1.3 Reagents	19
1.4 Apparatus	20
1.5 Commonly used buffer and other solution	21
1.5.1 The cultivation of cells relevant solution	21
1.5.2 SDS-PAGE relevant solution	21
1.5.3 Western blot relevant solution	22
1.5.4 The bacterial cultrue and gene cloning relevant solution	23
1.5.5 Immunofluorescence relevant solution	24
1.5.6 Agarose electrophoresis relevant solution	24
1.5.7 Antibiotics	24
1.5.8 Transfection relevant solution	25

2. Methods	25
2.1 Cell culture	25
2.2 Cell freezing	25
2.3 Cell recovery	25
2.4 The methods of gene clone	25
2.5 Cell transfection	27
2.5.1 The method of calcium phosphate.....	27
2.5.2 The method of lipofectin	27
2.6 RNA interference technique	28
2.7 Western Blotting analysis.....	28
2.8 The separation of nuclear and cytoplasm	29
2.9 RT-PCR.....	30
Chapter III Results and Analysis	32
1. TNF α induces the expression of Nur77	32
2. TNF α induces the expression of Nur77 by means of NF- κ B.....	32
3. TNF α up-regulates the protein level of Nur77 in the cell nucleus.....	33
4. Honokiol inhibits the protein expression of Nur77 that is induced by TNF α	34
5. Honokiol regulates the consistency the endogenous and exogenous Nur77 in the protein expression	35
6. The degradation of the protein Nur77	36
7. Honokiol and Nur77 influence the activity of acetyl-CoA carboxylase(ACC)	36
8. Honokiol and TNF α induce the apoptosis of cancer cells with synergistic effect.....	37
Chapter IV Discussion	39
Chapter VI Conclusion	41
References	42
Acknowledgements	49

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
NR	nuclear receptor	核受体
TR	Thyroid hormone Receptors	甲状腺激素受体
RAR	Retinoic Acid Receptor	维甲酸受体
RXR	Retinoid X Receptor	维甲酸 X 受体
VDR	Vitamin D3 Receptor,	维生素 D3 的受体
AR	androgen receptor	雄激素受体
ER	estrogen receptor	雌激素受体
PR	progesterone receptor	孕激素受体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
MR	mineralocorticoid receptor	盐皮质激素受体
NLS	nuclear localization signal	核定位信号
LBD	ligand-binding domain	配体结合区
AF	Activation function	转录激活功能域
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α	缺氧诱导因子-1 α
HRE	hormone response element	激素应答元件
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1	血浆酶原激活因子抑制剂 1
INSL3	Insulin-like3	激素胰岛素样 3
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase	磷酸肌醇-3 激酶
HK	honokiol	和厚朴酚
NF- κ B	nuclear factor-kappa B	核因子- κ B
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	艾滋病
TNFR I	tumor necrosis factor receptor I	肿瘤坏死因子受体 I
TNFR II	tumor necrosis factor receptor II	肿瘤坏死因子受体 II
DD	death domain	死亡结构域
TRADD	TNF receptor associated death domain protein	TNFR 相关死亡区蛋白 1

FADD	Fas receptor associated death domain protein	Fas 相关死亡区蛋白
FLICE	FADD like interleukin1 β converting enzyme protease	FADD 样 ICE 蛋白酶
RIP	receptor interacting protein	受体相互作用蛋白
TRAF	TNFR-associated factor	TNFR 相关因子
IKK	I κ B kinase	I κ B 激酶
ROS	reactive oxygen species	活性氧自由基
ACC	acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase	c-Jun 氨基末端激酶
MAPKs	mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶

厦门大学博士论文全文数据库

摘要

在许多肿瘤组织中，肿瘤坏死因子 α 能够促进肿瘤细胞生存和增殖。通常，在肿瘤微环境中肿瘤坏死因子 α 的主要来源是多种定向分化的巨噬细胞，而肿瘤坏死因子 α 可以激活 NF- κ B 以及 MAPK 等信号通路促进肿瘤细胞的生存。本文研究核受体 Nur77 在肿瘤坏死因子 α 相关的生存通路中的作用及和厚朴酚通过下调核受体 Nur77 蛋白水平抑制肿瘤坏死因子 α 介导的生存通路。

依据天然产物和厚朴酚治疗各种疾病的多效性，抑制肿瘤细胞增殖的高效性及治疗癌症的临床数据，结合和厚朴酚作为视黄醇 X 受体 α 的天然配体调控视黄醇 X 受体 α 转录活性的机制研究的提示，我们开展了本课题的研究工作。肿瘤坏死因子 α 通过肿瘤坏死因子受体通路诱导肿瘤细胞细胞核内 Nur77 的高表达，孤儿核受体 Nur77 作为一种立刻早期反应基因，在短时间内可被多种生长因子诱导表达，Nur77 在细胞核内能够激活多种生长因子基因的转录。我们的研究发现和厚朴酚能够抑制肿瘤坏死因子 α 诱导 Nur77 蛋白的高表达，同时，证明了和厚朴酚通过下调 Nur77 蛋白水平，进而逆转过度表达的 Nur77 对乙酰辅酶 A 羧化酶激活作用，间接地抑制了肿瘤细胞的增殖能力。

关键词：核受体；肿瘤坏死因子；和厚朴酚；

Abstract

In the many tumor tissues, tumor necrosis factor α (TNF α) can promote tumor cells to survive and proliferate. Generally, in the tumor microenvironment, the source of tumor necrosis factor α are many orientation differentiation macrophages. Tumor necrosis factor α could activate NF- κ B and MAPK (Mitogen-activated protein kinase) signaling pathways to improve the survival of tumor cells. This paper researches the relevant function of nuclear receptor Nur77 with tumor necrosis factor α in the survival pathway, the survival pathway that tumor necrosis factor α regulated is inhibited in the process where honokiol down-regulated the protein expression of nuclear receptor Nur77.

In accordance with the pleiotropy and the high efficiency of the natural product honokiol, it is commonly used to treat diseases, to inhibit the proliferation of tumor cells. Combination with the prompting of the molecular mechanism research about honokiol, honokiol mediate the transcriptional activity of RXR α , as the ligand of RXR α . We carried out the research work about this paper. Tumor necrosis factor α could induce the high expression of Nur77 in the nucleus of tumor cells by the signaling pathway that tumor necrosis factor receptor involves in. Orphan nuclear receptor Nur77 acts as an immediate-early gene, which expression can be rapidly induced by various stimuli including mitogenic agents. Nur77 activates the transcription regulations of many growth factor genes in the nucleus, then growth factors promote the proliferation of cancer cells. Our research found honokiol can inhibit the high expression of Nur77, which is induced by tumor necrosis factor α . Meanwhile, we proved honokiol down-regulates the protein level of Nur77, which downturn the activity of Acetyl-CoA carboxylase that the highly expressive Nur77 activates, then indirectly inhibits the proliferation of tumor cells.

Keywords: Nuclear Receptor; Tumor Necrosis Factor; Honokiol;

第一章 前言

1. 核受体

1.1 核受体介绍

核受体 (Nuclear Receptors, NRs) 超家族是真核细胞生物体内分布最广泛、功能多样的一大类蛋白, 由 48 个基因编码、29 个亚家族 200 余种蛋白质成员组成 29 个亚家族的超大家族蛋白群体, 通常分布于细胞核内或者与相应配体结合后由胞浆转到细胞核内发挥功能^[1], 不同配体刺激调控核受体在细胞内发挥相应的调控功能: 核受体受类固醇、维生素 A 和甲状腺激素等脂溶性小分子调控, 发挥广泛的生理功能, 如细胞生长、增殖、分化、代谢、免疫反应和凋亡等几乎所有的生物学过程^[2-5]。核受体这样一类生物功能广泛的蛋白质, 依据天然配体的种类分为三大类: 第一类是非类固醇激素受体: 如甲状腺激素受体 (Thyroid hormone Receptors, TR)、视黄酸受体 (Retinoic Acid Receptor, RAR、Retinoid X Receptor, RXR) 和维生素 D3 的受体 (Vitamin D3 Receptor, VDR) 等; 第二类是类固醇激素受体, 包括雄激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 和盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 等; 第三类是孤儿受体 (orphan nuclear hormone receptors)^[6], 是指尚未发现天然配体的受体, 如 Nur77、COUP - TF 等。

1.2 核受体的结构

核受体虽然种类多样, 功能不同, 但核受体却具有极其相似的分子结构, 从核受体蛋白质一级结构上分析得知: N 端到 C 段依次分为六个区域: 即 A、B、C、D、E 和 F 区^[7-9]。如图 1 所示, A/B 区包含一个不依赖于配体调控的转录激活域 (Activation function, AF) AF-1, 不同核受体之间该区长度不一, 一般由 50 至 500 个氨基酸组成; C 区为高度保守的 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD), 含两个锌指模体, 分别是 C-X2-C-X13-C-X2-C (锌指 I) 和 C-X5-C-X9-C-X2-C (锌指 II)^[10], 每个锌指结构由 4 个半胱氨酸和中心部位的一个锌离子螯合组成。在锌指 I 的柄部有三个不连续的氨基酸称为 P-盒, 它决定了受体作用的特异性; D 区为可变的绞链区, 该区由较短且不保守的氨基酸序列组成, 通常含有核定位信号肽 (nuclear localization signal, NLS)^[11]; E 区为配体结合区 (ligand binding domain, LBD), 其二级结构是由 12 个 α 螺旋组成, 功能是介导配体结合和二

聚化过程，该区域存在配体依赖性转录激活域 AF-2^[12, 13]；一些核受体在 C 端还含有一段多变的 F 区，目前还没有发现 F 区的特定功能。转录激活功能域 (activation function, AF)AF-1 和 AF-2 主要负责转录起始相关蛋白的招募^[14]。



图 1 核受体结构示意图

Fig.1 Structure of nuclear receptors

核受体与不同的配体和辅调节因子的相互作用赋予了它们功能的多样性，当配体和受体结合后，受体的空间构型将发生变化，诱导形成同源或异源二聚体，从而影响细胞的各种生理过程^[15, 16]。

2. 核受体Nur77概述

2.1 孤儿核受体Nur77的特性

Nur77 家族成员包括 Nur77(也称 TR3, NGFI-B, TIS1, NAK1), Nurr1(也称 RNR-1, TINUR, HZF-3), Nor1(MINOR, CHN, TEC)^[17]。这类核受体家族蛋白在结构和功能上具有不同于其他核受体的一面。以 Nur77 为代表的第三类核受体家族与其他两类核受体相比较，不同之处在于：（1）它是类孤儿受体，即至今未发现其相应的生理配体^[18, 19]。它的激活方式与其他核受体相比较有明显的不同之处：不需要配体即可发挥作用，存在非配体依赖性激活途径(如通过受体磷酸化等)；（2）Nur77 是一种立即早期基因，能够被一系列生理学环境变化及细胞内部生长因子和化学因子(应激反应、生长因子、钙、炎症因子、佛波酯、神经递质)及一系列物理刺激(机械振动以及膜去极化) 下短时间内迅速诱导表达^[17, 20-22]。许多相关研究结果表明，Nur77 在早期胚胎发育、淋巴细胞阴性选择^[23-26]、慢性炎症反应^[27-30]下丘脑垂体肾上腺供素轴^[31-33]和癌细胞增殖和凋亡^[34-36]中都具有重要的调控作用。在细胞不同的区域中，Nur77 发挥着调控细胞增殖或凋亡的作用。因为 Nur77 在人体健康及疾病中具有重要作用，所以它是药物开发的一个潜在靶点。

2.2 Nur77 促生长功能

最初Nur77被认为是一种能够被血清及生长因子等多种刺激迅速诱导表达的立刻早期基因，在这些生理背景下Nur77作为一种促生长转录因子，介导蛋白激酶A、蛋白激酶C、MAPK 和NF- κ B等多种促生长信号通路的激活^[17, 21, 22, 37]。

在大多数肿瘤细胞中 Nur77是过表达的，如胃癌^[38]、前列腺癌^[39]和大肠癌^[40]。Kolluri 等^[41]研究证实 Nur77蛋白能够直接促进细胞生长。首先，在前列腺组织中，癌组织中 Nur77表达量明显高于周围正常组织或良性病变组织^[39]；在肺癌细胞株中，如 H460和 Calu-6, Nur77过表达能加快细胞周期进程与增殖速度；其次，促有丝分裂物能够强烈诱导 Nur77蛋白表达。Nur77 促进肿瘤细胞增殖的方式之一可能是通过干扰视黄酸的反向调节作用实现的。在肺癌细胞中，过量表达 Nur77可以抑制视黄酸受体 β (RAR β) 的表达，从而引起肿瘤细胞对视黄酸药物的拮抗作用^[42, 43]，还能够通过和视黄醇 X 受体 (RXR α) 或者另一个孤儿受体 COUP-TF 的结合，抑制 RAR β 的表达^[44]。Nur77的过表达阻止了 A20 B 细胞中神经酰胺诱导的死亡，也阻止了纤维原细胞中的坏死因子诱导的细胞死亡。在缺氧的情况下，Nur77可以稳定并激活缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的表达，而缺氧诱导因子-1 α 是一个与肿瘤增殖和迁移密切相关的癌蛋白^[45]。在内皮细胞中，VEGF 诱导 Nur77家族基因的表达^[46]，同样会调控癌细胞的增殖过程。在巨噬细胞中发现，Nur77作为 NF- κ B 应答基因^[47]来调控 cyclin D2^[48] 的表达。在中央神经系统中，Nur77家族在活细胞中的功能已得到很好的确认。小鼠敲除 Nurr1导致中脑多巴胺能神经元不能发育及维持，但过表达 Nurr1 则增强神经干细胞对神经毒素 (6-hydroxy-dopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine) 的拮抗作用。

2.3 Nur77抑制癌细胞增殖作用

直到1994年 Nur77的促凋亡作用才首次被人们发现：T 细胞受体信号能够诱导 Nur77的过度表达，并伴随着 T 细胞凋亡^[49]。Nur77在肿瘤细胞中的促凋亡作用是在研究视黄酸相关分子 AHPN 的促凋亡作用时发现的^[50]。在肺癌细胞中可以通过 Nur77的反义 RNA 来阻止 Nur77的表达进而抑制凋亡，证实了 Nur77对 AHPN 促肿瘤细胞死亡作用的调节。此外，箭毒木中提取的毒性强心甙 D 能够有效抑制多种肿瘤细胞株的增殖，并伴随 Nur77表达的上调，可见 Nur77对肿瘤增殖具有负性调节作用^[51]。在小鼠中抑制 Nur77和 Nor-1 蛋白的作用，可导致致命的急性髓系白血病的发生，由此可见 Nur77作为肿瘤抑制剂的重要作用

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库