



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108938606 B

(45)授权公告日 2019.09.17

(21)申请号 201811032122.3

A61P 35/04(2006.01)

(22)申请日 2018.09.05

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102695418 A,2012.09.26,全文.

申请公布号 CN 108938606 A

Reis JS等.“Synthesis, antioxidant and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin cancer”.《Bioorg Med Chem》.2014,第22卷(第9期),2733-2738.

(43)申请公布日 2018.12.07

(73)专利权人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西601号

审查员 吕青

(72)发明人 何庆瑜 杨杰 李斌

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 黄莹 陈燕娴

(51)Int.Cl.

A61K 31/12(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

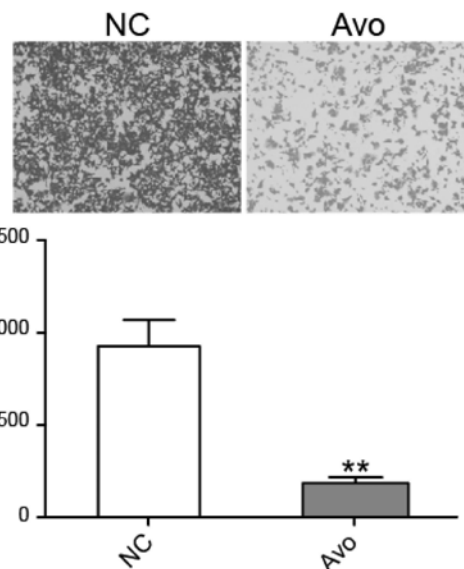
权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用

(57)摘要

本发明提供了阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明首次发现了阿伏苯宗可显著破坏PHB和c-Raf1两个蛋白质之间的相互作用,从而破坏肿瘤细胞信号通路,继而抑制肿瘤细胞生长;阿伏苯宗靶向肿瘤的特异性高,副作用较小且副作用应对措施较为明确。由于并非靶向单个基因或蛋白质,因此阿伏苯宗不会对癌细胞内特定分子或单一蛋白质产生持续药物压力而导致其产生突变,大大降低了临床耐药的出现。本发明进一步通过分子生物学实验和细胞学实验首次证实了阿伏苯宗能够显著抑制结肠癌细胞的转移,扩展了阿伏苯宗的应用范围,提高了其应用价值,对肿瘤治疗具有重要的现实意义。



1. 阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的肿瘤为结肠癌。
2. 根据权利要求1所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的阿伏苯宗的有效浓度为1~10 μ M。
3. 根据权利要求1所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的抗肿瘤药物含有一种或多种药学上可接受的载体或辅料。
4. 根据权利要求3所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的辅料为缓释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂或润滑剂中的至少一种。
5. 根据权利要求1所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的抗肿瘤药物可以采用本领域的常规方法制备成药物制剂。
6. 根据权利要求5所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的药物制剂为口服药物制剂。
7. 根据权利要求6所述的阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于:
所述的口服药物制剂为胶囊、丸剂、片剂、口服液、颗粒剂、酏剂。

阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,特别涉及阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 结肠癌是常见的恶性肿瘤,产生原因比较复杂,目前尚没有专门的靶向药物治疗该类型癌症。手术切除、放疗和化疗依然是结肠癌治疗的三大手段,然而传统治疗策略存在周期长、副作用大、易复发等缺点。原本开发用于肺癌治疗的靶向药物如吉非替尼等在临床上也可以用作结肠癌的治疗,然而这种靶标单个基因或蛋白的抗癌药物在临床使用一段时间后常会出现耐药现象。因此获得安全、高效、持久的结肠癌靶向药物具有迫切的现实意义。

[0003] 现有的化疗药物如顺铂类药物因不能特异性的杀死肿瘤细胞而具有较大的毒副作用并且易复发。现有的抗肿瘤靶向药物多为靶标单个癌基因或单个蛋白质的药物,该类药物能够特异识别肿瘤细胞,具有较好的治疗效果,靶标单个蛋白质分子的靶向药物如吉非替尼、厄洛替尼等常被用来治疗肺癌等类型癌症。虽然此类靶向药物也可以用来治疗结肠癌,但靶向基因在该类药物的持续作用压力下容易产生耐药突变,突变后的肿瘤细胞丧失了对药物的敏感性而不再被药物抑制,造成肿瘤复发。结肠癌细胞内频繁的基因突变使患者在用药2~3个月左右出现耐药性,即现有的靶向药物不能继续起效抑制肿瘤发展。因此开发新的结肠癌靶标药物具有重要现实意义。

[0004] 阿伏苯宗(Avobenzone)是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的抗紫外照射的小分子药物,该物质在紫外照射下能够被分解,因此是防晒类物质的主要成分之一,该物质已大规模应用于临床和市场。但是除防晒这一功能之外,阿伏苯宗的其他效用如癌症治疗并未见直接的研究或报道,现有技术中关于阿伏苯宗预防皮肤癌的报道主要是从分子生物学角度探讨了阿伏苯宗在预防皮肤癌方面的原理即药物在紫外线照射下分解抵消紫外光能量从而降低紫外光对皮肤的伤害,然而该文献并没有验证阿伏苯宗对已经出现的皮肤癌的治疗作用,也没有从细胞生物学角度研究并验证该药物对皮肤癌治疗的意义(Reis JS, Corrêa MA, Chung MC, Dos Santos JL. Synthesis, antioxidant and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin cancer. *Bioorg Med Chem* 2014;22(9):2733-8.)。

[0005] 目前,尚未见现有技术报道阿伏苯宗对癌细胞(尤其是结肠癌细胞)生长的影响与作用。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 阿伏苯宗在制备抗肿瘤药物中的应用。

- [0009] 所述的阿伏苯宗的有效浓度优选为1~10 μ M。
- [0010] 所述的抗肿瘤药物含有一种或多种药学上可接受的载体或辅料。
- [0011] 所述的辅料优选为缓释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂或润滑剂中的至少一种。
- [0012] 所述的抗肿瘤药物可以采用本领域的常规方法制备成各种剂型,如胶囊、丸剂、片剂、口服液、颗粒剂、酏剂等口服给药的剂型。
- [0013] 所述的肿瘤优选为结肠癌。
- [0014] 不同于传统的抗肿瘤靶向药物以单个基因或蛋白质为靶点起作用,本发明提供的结肠癌靶向药物阿伏苯宗是以肿瘤细胞信号通路中的蛋白质之间的相互作用为靶点,这就最大程度避免了耐药性的出现。具体来说,主要是通过破坏PHB和c-Raf1两个蛋白质之间的相互作用而起效,从而起到破坏整个信号通路,继而产生抑制结肠癌转移的效果。
- [0015] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0016] 1. 本发明首次发现了阿伏苯宗可显著破坏PHB和c-Raf1两个蛋白质之间的相互作用,并通过分子生物学实验和细胞学实验首次证实了阿伏苯宗能够显著抑制结肠癌细胞的转移,扩展了阿伏苯宗的应用范围,提高了其应用价值。
- [0017] 2. 与传统化疗药物相比,阿伏苯宗靶向肿瘤的特异性高,副作用较小且副作用应对措施较为明确。
- [0018] 3. 与现有的肿瘤靶向药物相比,阿伏苯宗并非靶向单个基因或蛋白质,而是靶标于两个蛋白质的相互作用,不会对癌细胞内特定分子或单一蛋白质产生持续药物压力而导致其产生突变,大大降低了临床耐药的出现。
- [0019] 4. 目前尚没有专门的肿瘤靶向药物用于结肠癌的治疗,本发明所提供的阿伏苯宗对结肠癌转移的抑制作用具有重要的现实意义。

附图说明

- [0020] 图1是实施例1中superELISA的操作步骤流程图。
- [0021] 图2是实施例1中不同小分子药物的吸光度值结果分析图。
- [0022] 图3是实施例2的免疫共沉淀实验结果图。
- [0023] 图4是实施例3的蛋白质免疫印迹实验结果图。
- [0024] 图5是实施例4的细胞侵袭实验结果分析图。

具体实施方式

- [0025] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。
- [0026] 实施例1通过superELISA技术研究阿伏苯宗的抗肿瘤机制
- [0027] 一、融合蛋白PHB1-his,C-Raf1-gst的制备
- [0028] (一) PHB1-his融合蛋白的表达纯化
- [0029] 1. 构建重组表达载体pET-his:根据NCBI数据库人源PHB1蛋白基因序列(NCBI登录号:NM_001281496.1),利用Primer Premier 5.0设计并合成编码PHB1基因的引物,在两端加入双酶切位点(上游末端酶切位点为BamH1,下游末端酶切位点为EcoR1,均购买自TAKARA

公司), PCR扩增出目的基因条带。

[0030] 2. 用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 利用DNA回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 货号: DP214)回收纯化目的片段。用内切酶进行双酶切目的基因片段及空载体pET(碧云天生物技术公司, 货号D2902), 分别取目的基因片段470ng和空载体200ng进行酶切, 条件为37℃酶切4h; 之后混合目的基因和空载体的酶切产物进行DNA纯化回收(总体积50μL), 取纯化回收产物35μL混合2μL T4DNA连接酶(Takara公司)+5μL缓冲液+8μL ddH₂O; 取10μL连接产物转化至E. coli Top10感受态细胞, 经卡纳抗性平板筛选阳性重组子, 对其进行菌落PCR验证及DNA测序验证, 经NCBI Blast比对分析测序结果。质粒置于-20℃长期保存, 菌株加入15%甘油保存于-80℃。

[0031] 3. 融合蛋白的诱导表达: 将测序正确的Top10-pET-PHB1接种于含有氨苄抗性(100ng/μL)的LB培养基中, 37℃振荡培养过夜。次日将活化的菌种按1:100比例将菌液接入新鲜培养基扩大培养, 在37℃以220rpm振荡培养至OD₆₀₀=0.6~0.8时, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), IPTG终浓度为0.5mM, 同样的条件继续诱导表达4~6h后收集菌体, 4700rpm于4℃离心45min, 1×PBS缓冲液重悬菌体并再次离心收集菌体。将收集到的菌体于液氮和37℃反复冻融3次, 然后冰浴超声30min(5s开, 5s关)至菌液变澄清透亮, 超声破碎物于4℃以10000rpm离心30min, 弃沉淀, 0.22mm孔径滤膜过滤上清, 上清用于过柱纯化。取少量上清(约15μL)用12%SDS-PAGE检测融合蛋白表达状况。

[0032] 4. 采用QIAGEN公司的Ni-NTA亲和层析纯化柱对重组蛋白进行纯化。具体步骤为:

[0033] (1) 将Ni-NTA树脂混匀后, 取2mL上柱, 室温静置30min。

[0034] (2) 用10倍柱体积灭菌超纯水ddH₂O清洗柱子。

[0035] (3) 用10倍柱体积的平衡缓冲液平衡柱子。

[0036] (4) 将收集的上清样液缓缓装入层析柱中。

[0037] (5) 用10倍柱体积的平衡液冲洗树脂并收集上样流出液;

[0038] (6) 分别用含有10mM咪唑, 25mM咪唑, 50mM咪唑, 100mM咪唑和500mM咪唑的缓冲液洗脱镍柱, 分别收集洗脱液。用12%SDS-PAGE对PHB1-his融合蛋白的表达量及纯度进行检测。

[0039] (7) 分别用10倍柱体积的平衡缓冲液(20mM十二水合磷酸钠, 500mM NaCl, pH 7.0~7.5)和10倍柱体积ddH₂O清洗柱子, 向柱子中加入5mL的20%乙醇, 4℃保存。

[0040] 5. KCTD12-his融合蛋白的浓缩: 利用10KD超滤管(Millipore, 货号: ACS501012)进行融合蛋白浓缩, 5000rpm离心, 4℃超滤至500μL, 之后使用20mM Tris-HCl(含100mM NaCl)冲洗浓缩液三次, 并重复离心三次。获得的浓缩蛋白使用BCA蛋白浓度检测试剂盒(ThermoFisher, 货号: 23227)测得浓度并放置在-80℃保存。

[0041] (二) C-Raf1-gst融合蛋白的表达纯化

[0042] 1. 构建重组表达载体pGEX-4T-1-C-Raf1-gst: 根据NCBI数据库人源C-Raf1蛋白基因序列(NCBI登录号: NM_001354689.1), 利用Primer Premier 5.0设计并合成编码C-Raf1基因的引物, 在两端加入双酶切位点(上游末端酶切位点为BamH1, 下游末端酶切位点为EcoR1, 均购买自TAKARA公司), PCR扩增。

[0043] 2. 用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 利用DNA回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 货号: DP214)回收纯化目的片段。分别取目的基因片段680ng和空载体200ng进行酶切,

条件为:37℃酶切4h;之后混合目的基因和空载体的酶切产物进行DNA纯化回收(总体积50μL),取纯化回收产物35μL混合2μL T4DNA连接酶(Takara公司)+5μL缓冲液+8μL ddH₂O,混合均匀于16℃连接过夜;取10μL连接产物转化至E.coli BL 21感受态细胞,经氨苄抗性平板筛选阳性重组子,对其进行菌落PCR验证及DNA测序验证,经NCBI Blast比对分析测序结果。质粒置于-20℃长期保存,菌株加入15%甘油保存于-80℃。

[0044] 3.融合蛋白的诱导表达:将测序正确的BL 21-PGEX-4T-1-C-Raf1接种于含有氨苄抗性(100ng/μL)的LB培养基中,37℃振荡培养过夜。次日将活化的菌种按1:100比例将菌液接入新鲜培养基扩大培养,在37℃以220rpm振荡培养至OD₆₀₀=0.6~0.8时,加入IPTG至终浓度为0.5mM,同样的条件继续诱导表达4~6h后收集菌体,4700rpm于4℃离心45min,1×PBS缓冲液重悬菌体并再次离心收集菌体。将收集到的菌体于液氮和37℃反复冻融3次,然后冰浴超声30min(5s开,5s关)至菌液变澄清透亮,超声破碎物于4℃以10000rpm离心30min,弃沉淀,上清用于过柱纯化。取少量上清(约15μL)用12%SDS-PAGE检测融合蛋白表达状况。

[0045] 4.采用GE公司的GST亲和层析纯化柱对重组蛋白进行纯化,具体步骤为:

[0046] (1)将GST亲和层析树脂混匀后,取2mL上柱,室温静置30min。

[0047] (2)用10倍柱体积灭菌超纯水dd H₂O清洗柱子。

[0048] (3)用10倍柱体积的Binding buffer(1×PBS,pH 7.4)平衡柱子。

[0049] (4)将收集的上清样液缓缓装入层析柱中。

[0050] (5)用10倍柱体积的Binding buffer洗下杂蛋白。

[0051] (6)用5倍柱体积的Elution buffer(10mM谷胱甘肽+50mM Tris-HCl)洗脱,收集流出液,即C-Raf1-GST融合蛋白。用12%SDS-PAGE对C-Raf1-GST融合蛋白的含量及纯度进行检测。

[0052] (7)用10倍柱体积的Binding buffer和10倍柱体积ddH₂O清洗柱子,向柱子中加入5mL的20%乙醇,4℃保存。

[0053] 5.融合蛋白的浓缩:利用10KD超滤管(Millipore,货号:ACS501012)进行融合蛋白浓缩,5000rpm离心,4℃超滤至500μL,之后使用1×PBS冲洗浓缩液三次,并重复离心三次。获得的浓缩蛋白使用BCA蛋白浓度检测试剂盒(ThermoFisher,货号:23227)测得浓度并放置在-80℃保存。

[0054] 二、设置superELISA实验

[0055] 相关操作步骤流程图如图1所示。

[0056] 1.包被:根据ELISA的包被方法进行第一层抗体gst-tag antibody(货号:66001-2-Ig,购自Proteintech Group)的包被,使用普通ELISA包被液(购自NeoBioscience,货号:NBC01)将抗体配制为浓度为1ng/μL的抗体稀释液,每个96孔ELISA板的孔中加入100μL抗体稀释液,4℃包被过夜。

[0057] 2.封闭:使用磷酸盐缓冲液(PBS)(PBS:4g NaCl,0.1g KCl,1.815g十二水合磷酸氢二钠,0.12g磷酸氢二钾,溶解在400mL的超纯水中,定容至500mL使用)清洗ELISA板1次5分钟;每孔加入300μL 5%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)(PBS配制);37℃封闭2小时。

[0058] 3.加入纯化的蛋白质C-Raf1-gst:将1μg纯化蛋白预先混匀稀释在200μL PBS中,按照1μg/孔加入稀释后的C-Raf1-gst蛋白,最终每个孔中的蛋白质浓度为5μg/mL,室温慢

摇5小时;之后按照上述清洗方法清洗ELISA板5次,每次5分钟。

[0059] 4.加入纯化的蛋白质PHB1-his:将1 μ g纯化蛋白预先混匀稀释在200 μ L PBS中,按照1 μ g/孔加入稀释后的PHB1-his蛋白,最终每个孔中的蛋白质浓度为5 μ g/mL;37 $^{\circ}$ C静置孵育3~4小时;之后按照上述清洗方法清洗ELISA板5次,每次5分钟。与此同时将计算好的药物加入反应孔中,使药物终浓度为10 μ M。

[0060] 5.加入his-tag antibody(货号:ab9108,购自Abcam)抗体:按照1:2000比例,将1 μ g抗体在2000 μ L 5%BSA中稀释,得到抗体稀释液,每孔加入100 μ L抗体稀释液,室温孵育2小时或者4 $^{\circ}$ C孵育过夜。注意:gst-tag antibody抗体来源属性需与his-tag antibody抗体属性不同,在本实施例中,gst-tag antibody是鼠抗,his-tag antibody是兔抗。

[0061] 6.清洗掉多余抗体:清洗方法如上,清洗5次,每次5分钟。

[0062] 7.孵育二抗:将能够结合his-tag antibody一抗的带有辣根过氧化酶的二抗山羊抗兔IgG HRP(货号:ab6721;购自Abcam)按照质量体积比1:2000,将抗体1 μ g稀释到2000 μ L的5%BSA中,得到抗体稀释液,每孔加入100 μ L抗体稀释液进行孵育。

[0063] 8.显色:每孔加入100 μ L普通ELISA显色液TMB(货号:TMS.12,购自NeoBioscience),37 $^{\circ}$ C放置1分钟,立即用50 μ L终止液(货号:EST001,购自NeoBioscience)终止显色。

[0064] 9.读取数值:待显色稳定后使用分光光度计进行双波长测定,按照OD450-OD630计算得到每个孔的吸光度值,进而分析药物作用效果。

[0065] 用于本实验筛选的药物来源于美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于临床使用的小分子药物库(FDA-approved Drug Library,购自Selleck,货号:L1300)。本实施例中一共对88个小分子药物进行了研究筛选,该批次小分子药物随同纯化的PHB1-his蛋白质一起加入反应体系中(即上述步骤(4))。

[0066] 三、筛选结果分析

[0067] 利用superELISA技术从FDA小分子药物库中研究能够特异性抑制PHB和c-Raf1相互作用的小分子药物。共有88个小分子药物参与研究,结果如图2所示,横线指只进行蛋白质相互作用,不加药处理的阳性对照组,横线及横线以上指未出现抑制效果的药物,横线以下指出现了抑制效果的药物。分析时与同一块ELISA板上的对照组作比较(吸光度值接近零的几组即为阴性对照组,横线上的一组为阳性对照组)。其中阿伏苯宗对PHB-c-Raf 1相互作用的抑制最为明显(箭头指向处)。

[0068] 根据文献报道,PHB和c-Raf1的相互作用是导致肿瘤恶化的重要因素,抑制两者的相互作用具有很好的抑制癌细胞转移和增殖效果(Chiu CF, Ho MY, Peng JM, Hung SW, Lee WH, Liang CM, et al. Raf activation by Ras and promotion of cellular metastasis require phosphorylation of prohibitin in the raft domain of the plasma membrane. *Oncogene* 2013;32(6):777-87., Doudican NA, Orlow SJ. Inhibition of the CRAF/prohibitin interaction reverses CRAF-dependent resistance to vemurafenib. *Oncogene* 2017;36(3):423-428.)。

[0069] 本实施例通过superELISA实验证明了阿伏苯宗能够特异性抑制PHB和c-Raf1相互作用。

[0070] 实施例2免疫共沉淀实验

[0071] 免疫共沉淀实验 (Co-IP) 是检验蛋白质体内相互作用重要手段,为了进一步研究验证阿伏苯宗的抗癌机制和效果,本实施例进行免疫共沉淀实验 (Co-IP) 对阿伏苯宗的作用进行进一步研究。Co-IP具体操作步骤如下:

[0072] (1) 提前将2组,每组100万个结肠癌HCT116细胞铺在细胞培养皿中,并分别加入DMSO和阿伏苯宗。DMSO按照1 μ L:1000 μ L DMEM培养液比例加入,阿伏苯宗使用DMEM培养液稀释,最终浓度均为10 μ M;

[0073] (2) 37 $^{\circ}$ C环境下培养处理细胞24小时,之后用PBS清洗细胞两次,每个培养皿加1mL 0.25%胰酶消化细胞使其脱落培养皿壁;随后用每孔5mL完全培养液终止消化,300g转速常温离心3分钟,收集细胞并用5mL PBS重悬,重复离心1次。

[0074] (3) 将清洗好的结肠癌细胞收集到1.5mL的EP管中。加入配置好的裂解液,此裂解液为含有1%PMSF、1%PI和磷酸酶抑制剂的western及IP裂解液(货号:P0013,购自碧云天生物技术公司),冰上裂解,每5min上下颠倒几次,轻柔的,不能涡旋,裂解30min后,13200rpm 4 $^{\circ}$ C离心30min。

[0075] (4) 取上清至新EP管,使用BCA法测蛋白浓度,随后每组取1mg蛋白质进行Co-IP反应。每组加入Protein A/G agarose 30 μ L和兔IgG(货号:10284-1-AP;购自Proteintech) 1 μ g,4 $^{\circ}$ C旋转孵育1小时。随后4 $^{\circ}$ C,2500rpm离心5min,取上清蛋白样至新EP管中。此步骤为去除样品中能与下一步中PHB1抗体孵育时非特异性结合的蛋白质。

[0076] (5) DMSO处理的对照组蛋白样中加入2 μ g兔IgG抗体,阿伏苯宗处理的蛋白样中加入2 μ g PHB1抗体(货号:2426s;购自Cell Signaling Technology)作为实验组,4 $^{\circ}$ C旋转孵育16~18h。

[0077] (6) 每组样品中加入30 μ L Protein A/G agarose beads,4 $^{\circ}$ C旋转孵育4h。

[0078] (7) 2500rpm离心5分钟,去除上清;用western及IP裂解液洗轻柔润洗beads,之后2500rpm离心5分钟,重复三次。去除上清液,每组加入30 μ L SDS裂解液(货号:P0013G;购自碧云天生物技术公司)。涡旋震荡一分钟,开水煮10min。离心,将上清进行SDS-PAGE电泳分离及western blot分析Co-IP效果。

[0079] Western blot步骤参考文献:细胞周期中蛋白质更新的定量蛋白质组学研究.何桂卫.硕士毕业论文)。

[0080] 结果如图3所示,Co-IP证明阿伏苯宗能够显著破坏PHB1-C-Raf1的作用。

[0081] 本实施例通过分子生物学手段证明阿伏苯宗能够显著抑制PHB1和C-Raf1的相互作用,能够破坏结肠癌细胞中与癌细胞转移相关的信号通路,证明了阿伏苯宗对结肠癌细胞信号通路的影响。

[0082] 实施例3MEK激活水平研究

[0083] 蛋白质MEK是PHB-c-Raf1信号通路的下游分子,通过检测MEK的激活水平即磷酸化状态(pMEK)可以证实PHB和c-Raf1之间的相互作用是否被破坏。pMEK水平的降低也意味着结肠癌细胞的转移能力下降。

[0084] 通过蛋白质免疫印迹(western blot)的方法检测MEK的激活水平,具体步骤如下:

[0085] 1. 将结肠癌细胞HCT116或结肠癌细胞RKO(购自ATCC,货号CRL-2577)铺在六孔板中,每孔50万细胞。分别往培养孔中加DMSO(对照组)和阿伏苯宗(实验组)各2 μ L,每个孔加入DMEM完全培养液2000 μ L,其中阿伏苯宗的终浓度为10 μ M。混匀培养液,37 $^{\circ}$ C培养处理细胞

48小时。

[0086] 2. PBS清洗细胞两次,每个孔加0.5mL 0.25%胰酶消化细胞使其脱落培养皿壁;随后用每孔1mL完全培养液终止消化,细胞悬液收集到1.5mL EP管中,300g转速常温离心3分钟,收集细胞并用1mL PBS重悬,重复离心1次。

[0087] 3. 去除上清,每组加入配置好的裂解液50 μ L,此裂解液为含有1%PMSF、1%PI和磷酸酶抑制剂的SDS细胞裂解液(货号:P0013G;购自碧云天生物技术公司)。冰上裂解,每5min涡旋震荡一次,裂解30min后,13200rpm 4 $^{\circ}$ C离心30min。

[0088] 4. 使用BCA法测蛋白浓度,并各取每组30 μ g蛋白进行western blot实验,具体步骤参考:细胞周期中蛋白质更新的定量蛋白质组学研究.何桂卫.硕士毕业论文。本实验分别用到的抗体为MEK,pMEK,Actin对应的一抗,均购自Cell Signaling Technology公司,货号分别为4694S,9154S,3700S。所有一抗浓度均为1:2000(1 μ g蛋白质稀释在2000 μ L 5%BSA中)。

[0089] 5. WB实验得到阿伏苯宗处理后(实验组)结肠癌细胞中MEK激活水平的变化,该变化通过pMEK水平的高低来体现。

[0090] 蛋白质免疫印迹实验结果如图4所示,表明阿伏苯宗(Avo)处理的结肠癌细胞中的MEK磷酸化(pMEK)水平降低,进一步确证了阿伏苯宗抑制了PHB和c-Raf1之间的相互作用。

[0091] 实施例4细胞侵袭试验研究

[0092] 1. 将HCT116结肠癌细胞系(货号:CCL-247,购自美国模式培养物集存库ATCC)铺到六孔板中,每孔50万个细胞。配制原始浓度为10mM阿伏苯宗,加药时按照2 μ L药物+2000 μ L细胞培养液的比例,使细胞接触到的药物最终浓度为10 μ M,10 μ M浓度的阿伏苯宗处理结肠癌细胞48小时,之后用胰酶消化细胞,用无血清培养液重悬细胞并计数准备细胞侵袭实验。以DMSO处理的细胞实验组作为阴性对照组(NC)。

[0093] 2. 小室准备:先把干净无菌的小室放置在Transwell专用的24孔板的孔里,确保放平;之后将5 μ L基质胶与95 μ L预冷无血清培养液混合均匀小心铺到小室上室中,室温静置30分钟后吸掉溶液,此时基质胶会在小室上室形成胶质薄层,用以模拟人体内血管壁等基质类结构。

[0094] 3. 在24孔板上靠孔壁轻轻加入600 μ L完全培养基,保证小室底膜和培养基充分接触,没有气泡阻隔,然后把细胞悬液充分混匀,在每个小室里轻轻均匀滴加等体积等数量的200 μ L细胞悬液,确保细胞铺的均匀。

[0095] 4. 将种好的细胞培养板固定好,放置在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养48小时。

[0096] 5. 细胞固定:取出小室,轻轻地在PBS中润洗两遍,加甲醇固定底膜细胞30min。

[0097] 6. 结晶紫染色:用PBS洗两次,除去甲醇,用0.1%结晶紫染色20min。

[0098] 7. 洗净观察:用PBS或纯水洗去小室上的结晶紫,并湿润的棉签轻轻擦掉小室上层未穿膜的细胞,并洗干净。

[0099] 8. 拍照:把清洗干净的小室晾干,置于干净的24孔板,在倒置荧光显微镜下观察,并且在每一个小室选取相同位置的5个视野(上、下、左、右、中)拍照;

[0100] 9. 统计分析:利用软件ImageJ计算照片上的细胞或者计算其覆盖面积,进行统计分析。

[0101] 结果如图5所示,阿伏苯宗处理的细胞(实验组)与DMSO处理的对照组之间的细胞

相比,侵袭能力下降了4倍,表明阿伏苯宗能够显著抑制结肠癌细胞的转移。

[0102] 以上实施例证明阿伏苯宗能够显著破坏蛋白质PHB和c-Raf1之间的相互作用,并因此能够强效的抑制结肠癌细胞的转移,具有重要的临床价值和商业价值。

[0103] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

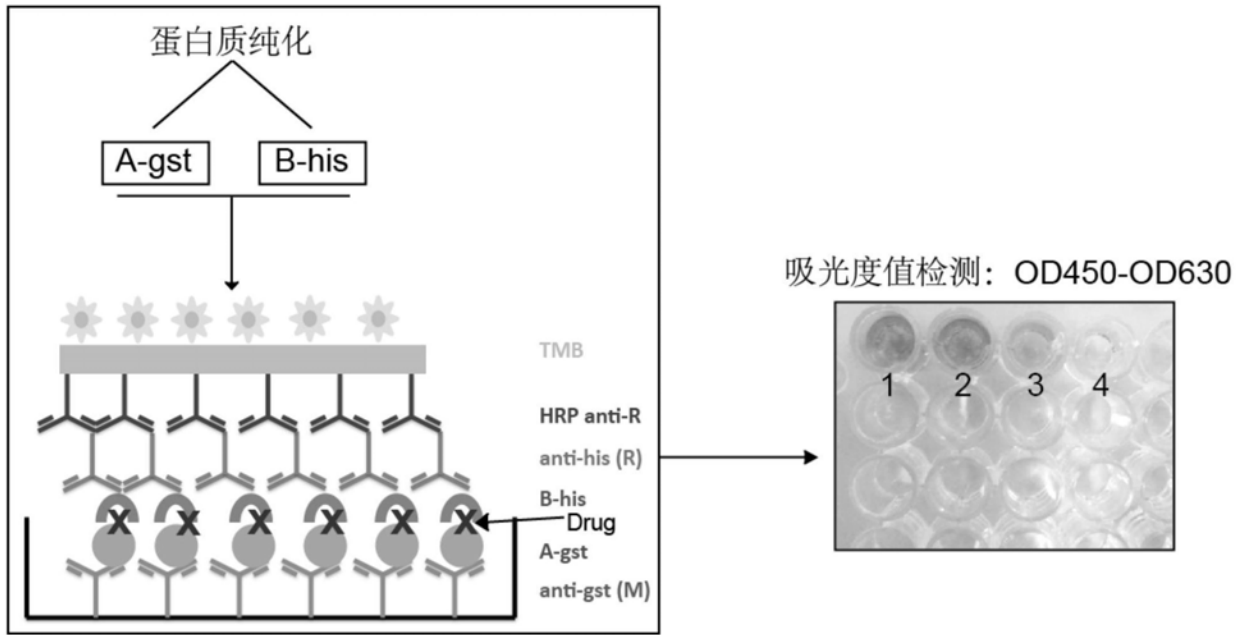


图1

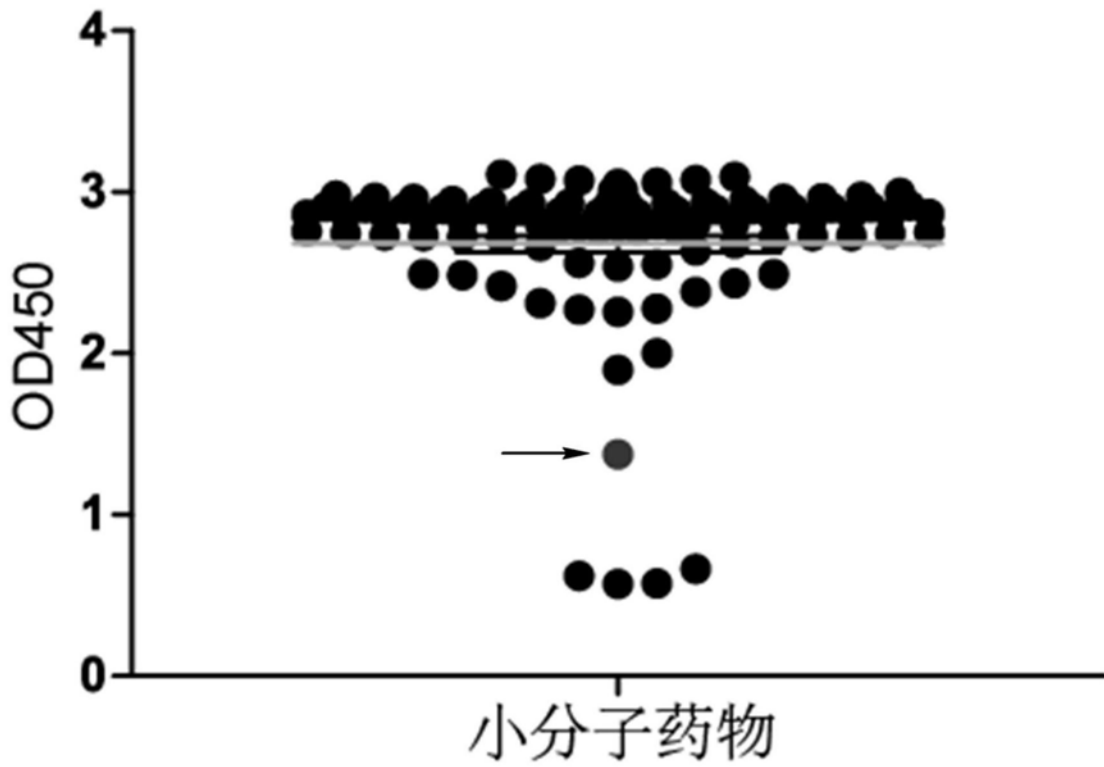


图2

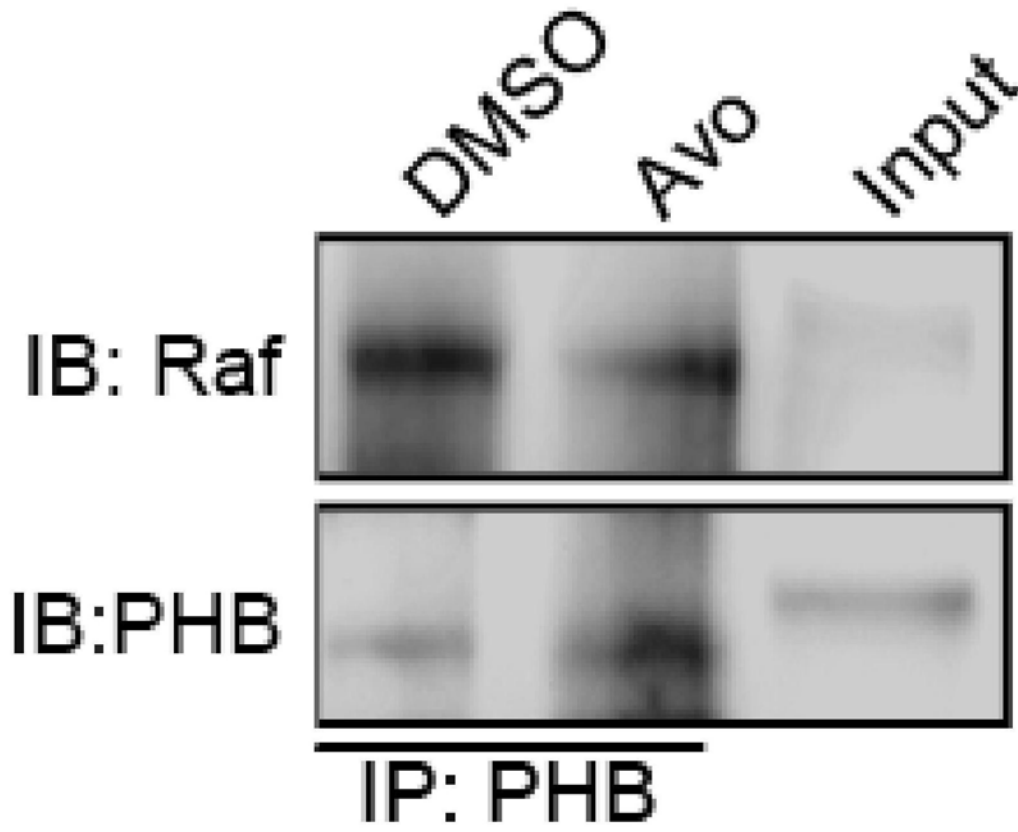


图3

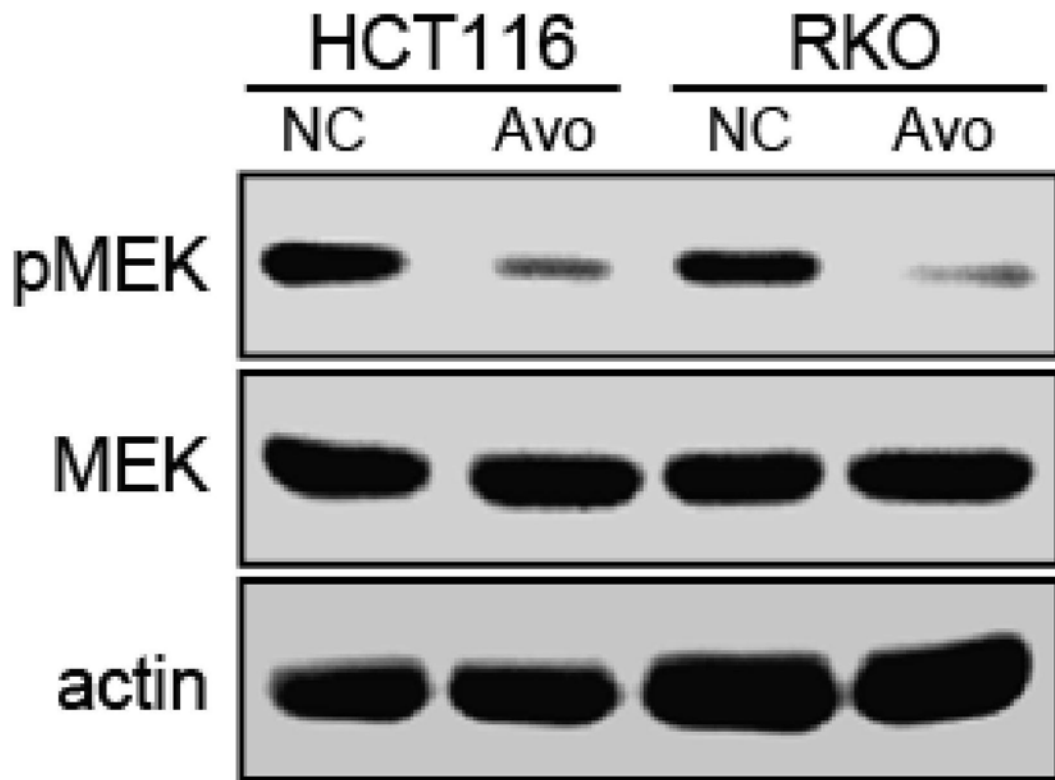


图4

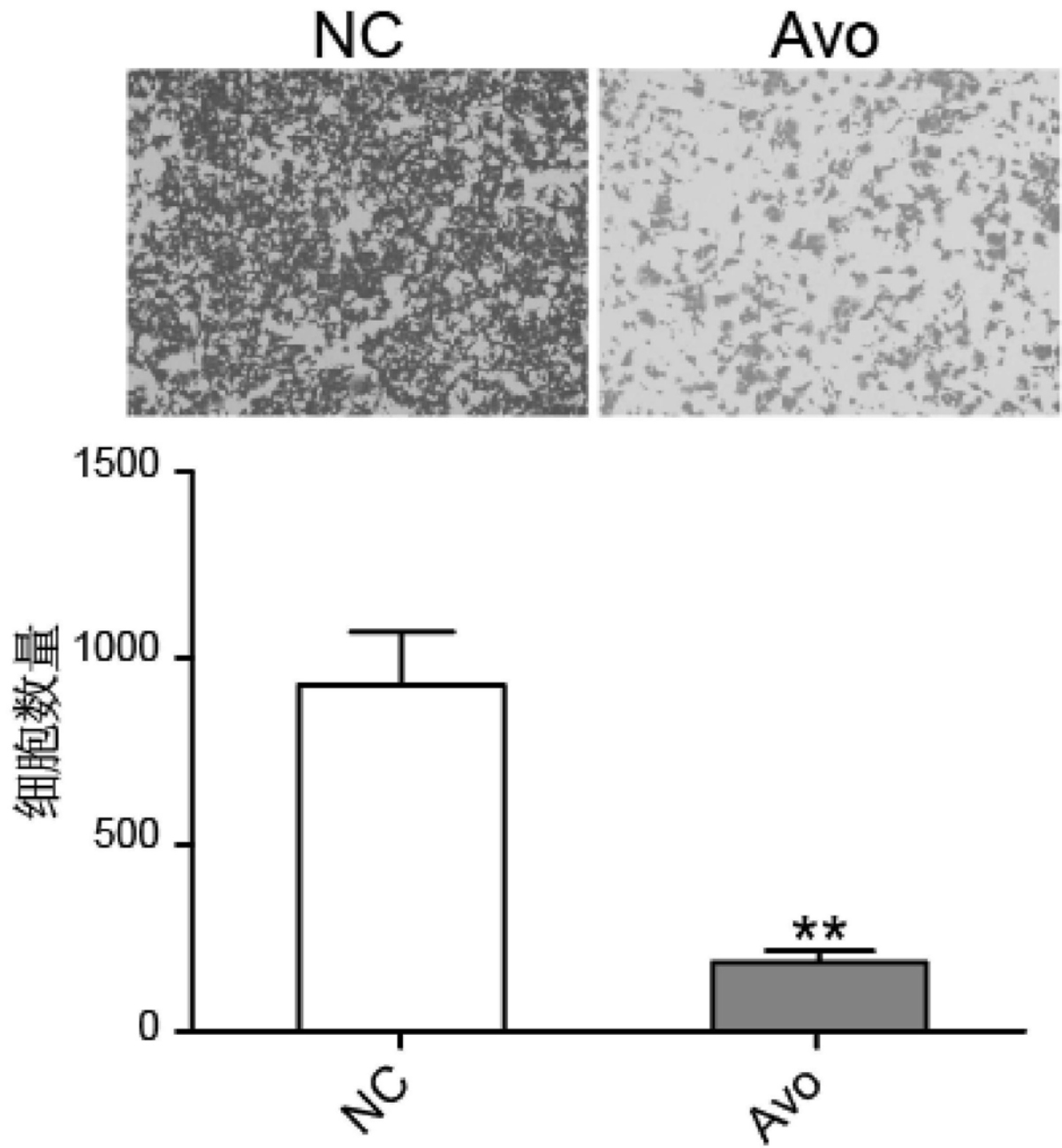


图5