



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104833782 B

(45) 授权公告日 2016. 07. 06

(21) 申请号 201510234048. 3

(22) 申请日 2015. 05. 08

(73) 专利权人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

地址 730000 甘肃省兰州市七里河区小西湖硷沟沿 335 号

(72) 发明人 张世栋 董书伟 王东升 严作廷 杨峰 王旭荣 张景艳 褚敏

(74) 专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理有限公司 11249

代理人 吕玉博

(51) Int. Cl.

G01N 33/15(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101463343 A, 2009. 06. 24, 说明书第 3-4 页具体实施方式, 说明书附图 1-5.

CN 103983770 A, 2014. 08. 13, 全文.

CN 104017882 A, 2014. 09. 03, 1.

WO 2006/129867 A2, 2006. 12. 07, 全文.

叶秋容 等. 天然免疫分子乳铁蛋白的抗炎机制. 《生命的化学》. 2013, 第 33 卷 (第 3 期), 第 69、71 页.

审查员 飞竹玲

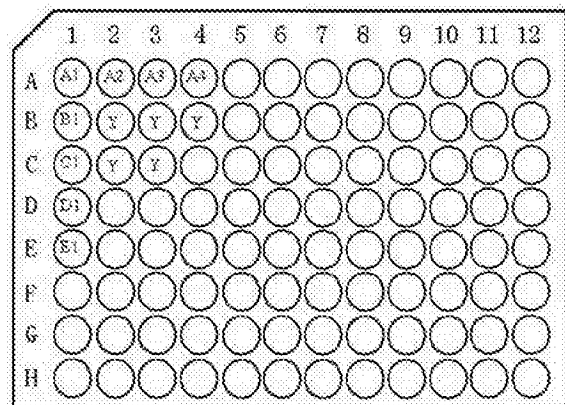
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法

(57) 摘要

本发明提供一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法, 是将体外培养的奶牛子宫内膜上皮细胞进行炎性化, 再加入待检药物, 通过检测细胞中炎症蛋白的表达变化, 来确定待检药物的抗炎活性: 若炎症蛋白表达量降低, 则待检药物具有抗炎活性, 且表达量降低倍数为待检药物相对抗炎活性大小; 反之则无抗炎活性; 其中, 所述炎症蛋白为乳铁蛋白。本发明的体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法, 可以实现体外对待检药物抗奶牛子宫内膜炎活性进行简便、快速的筛选和检测。当使用多孔板时, 能够实现高通量的筛选和检测, 筛选和检测结果对中药的现代临床应用和现代化发展具有重要的参考价值。



1. 一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法,其特征在于:是将体外培养的奶牛子宫内膜上皮细胞进行炎性化,再加入待检药物,通过检测细胞中炎症蛋白的表达变化,来确定待检药物的抗炎活性:若炎症蛋白表达量降低,则待检药物具有抗炎活性,且表达量降低倍数为待检药物相对抗炎活性大小;反之则无抗炎活性;其中,所述炎症蛋白为乳铁蛋白;具体步骤如下:

- (1)细胞培养;
- (2)细胞炎性反应诱导,使之成为炎性细胞;
- (3)待检药物处理炎性细胞:将待检药物加入到炎性细胞培养液中培养;
- (4)细胞及其蛋白质固定;
- (5)封闭;
- (6)抗原抗体反应:加入带有荧光素标记的炎症蛋白抗体,进行反应;
- (7)荧光信号检测、数据计算和结果分析。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述待检药物为中药或天然产物。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述检测为荧光检测。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述细胞及其蛋白质固定是用三氯醋酸缓冲液进行了固定。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(7)中所述数据计算的公式为:

$$Y = \frac{n(P-N)}{4X}, \text{ 其中 } n \text{ 为药物处理的复孔数; } P \text{ 为阳性对照组的光吸收总和; } N \text{ 为空白对照组各孔光吸收总和, } X \text{ 为同一药物处理复孔的光吸收总值, } Y \text{ 为药物的抗炎活性比值。}$$

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:当 $Y \geq 1$ 时,则待检药物无抗炎活性;当 $Y < 1$ 时,则待检药物有抗炎活性;当 $Y \leq 0.5$ 时,则待检药物有显著抗炎活性。

7. 根据权利要求1、2、4、5或6所述的方法,其特征在于:所述体外筛选和检测为体外高通量筛选和检测,使用多孔板同时培养细胞,在其中加入不同待检药物。

8. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述体外筛选和检测为体外高通量筛选和检测,使用多孔板同时培养细胞,在其中加入不同待检药物。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述多孔板为适用于荧光检测的黑边底透光的微孔板。

10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述多孔板为适用于荧光检测的黑边底透光的微孔板。

一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法。

背景技术

[0002] 炎症是十分常见而又重要的病理过程,抗炎药物的创制必不可少,而寻找安全有效的抗炎药物需要选择合适的炎症模型来筛选和评价抗炎效果。近年来,随着细胞培养技术的迅速发展,炎症细胞模型在国内外广泛用于炎症机制研究,并认为可用于药物抗炎活性筛选的研究。随着“无抗生素”时代的到来,中药的抗炎作用受到了广泛关注。临床及实验证实很多中药都具有很好的抗炎作用。构建有效的评估方法在开发中药抗炎功效方面是一项非常重要的策略。

发明内容

[0003] 本发明提供一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法。是利用体外培养的奶牛子宫内膜上皮细胞,通过检测细胞中炎症蛋白的表达变化反映中药的抗炎活性,方便快捷。如采用多孔板培养细胞,则可同时检测几十种甚至几百种药物,从而实现药物的高通量筛选。其中,炎症蛋白为乳铁蛋白。

[0004] 奶牛子宫内膜炎是子宫上皮细胞的炎症过程。本申请人经研究发现,在奶牛发生子宫内膜炎后,子宫内膜组织细胞中乳铁蛋白(Lactoferrin)表达极显著升高,且抗炎药物对该蛋白的表达量具有显著的下调作用。因此,通过检测乳铁蛋白(Lactoferrin)在体外上皮细胞中的表达变化间接反应待检药物的抗炎活性,从而判断所测试药物是否具有显著地抗炎作用,能够为治疗奶牛子宫内膜炎提供临床前基础。

[0005] 本发明提供一种体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法,是将体外培养的奶牛子宫内膜上皮细胞进行炎性化,再加入待检药物,通过检测细胞中炎症蛋白的表达变化,来确定待检药物的抗炎活性:若炎症蛋白表达量降低,则待检药物具有抗炎活性,且表达量降低倍数为待检药物相对抗炎活性大小;反之则无抗炎活性;其中,所述炎症蛋白为乳铁蛋白。

[0006] 本发明的方法中待检药物优选为中药或天然产物。

[0007] 优选地,所述检测为荧光检测。

[0008] 优选地,步骤如下:

[0009] (1)细胞培养;

[0010] (2)细胞炎性反应诱导,使之成为炎性细胞;

[0011] (3)待检药物处理炎性细胞:将待检药物加入到炎性细胞培养液中培养;

[0012] (4)细胞及其蛋白质固定;

[0013] (5)封闭;

[0014] (6)抗原抗体反应:加入带有荧光素标记的炎症蛋白抗体,进行反应;

[0015] (7)荧光信号检测、数据计算和结果分析。

[0016] 优选地,所述细胞及其蛋白质固定是用三氯醋酸缓冲液进行了固定。三氯醋酸可使细胞中蛋白质构象发生改变,暴露出较多的疏水基团,使之聚集沉淀于多孔板孔底,是一种理想高效的蛋白变性固定剂。

[0017] 优选地,步骤(7)中所述数据计算的公式为:

[0018] $Y = \frac{n(P-N)}{4X}$,其中n为药物处理的复孔数;P为阳性对照组的光吸收总和;N为空白对照组各孔光吸收总和,X为同一药物处理复孔的光吸收总值,Y为药物的抗炎活性比值。

[0019] 优选地,当 $Y \geq 1$ 时,则待检药物无抗炎活性;当 $Y < 1$ 时,则待检药物有抗炎活性;当 $Y \leq 0.5$ 时,则待检药物有显著抗炎活性。

[0020] 优选地,所述体外筛选和检测为体外高通量筛选和检测,使用多孔板同时培养细胞,在其中加入不同待检药物。从而实现多种待检药物同时检测。

[0021] 高通量药物筛选是以体外的分子或细胞水平的筛选模型为基础,进行大量化合物药理活性的筛选,以及多样性大规模样品库的构建。高通量药物筛选技术可以提供全新的筛选方法和手段,具有快速、高特异性、高灵敏度的特点,可极大地提高筛选速度和效率。

[0022] 进一步地,所述多孔板为适用于荧光检测的黑边底透光的微孔板。

[0023] 大多数的中药制剂或天然产物都本身具有颜色,药物本身的颜色往往影响一般的光吸收检测法。本发明使用荧光检测,在暗处检测,药物本身的颜色影响可被消除,同时,使用荧光检测方便快捷,精确度高。

[0024] 本发明的体外筛选和检测抗炎药物的方法,可以实现在体外对待检药物抗奶牛子宫内膜炎活性进行简便、快速的筛选和检测。当使用多孔板时,能够实现高通量的筛选和检测,筛选和检测结果对中药的现代临床应用和现代化发展具有重要的参考价值。

附图说明

[0025] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0026] 图1为细胞各种处理方式的分布图。图中除A1、A2、A3、A4、B1、D1、C1和E1之外,其余微孔均为药物处理孔Y;

[0027] 图2为用荧光免疫印迹法检测体外培养的奶牛子宫内膜上皮细胞中在炎症反应细胞和抗炎中药穿心莲干预治疗后,细胞中乳铁蛋白的表达变化。

具体实施方式

[0028] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0029] 实施例1

[0030] 本发明的体外筛选和检测抗奶牛子宫内膜炎药物的方法具体步骤如下:

[0031] 一、奶牛子宫内膜上皮细胞培养:取对数生长期的奶牛子宫内膜上皮细胞接种培养于黑色底透96微孔板中,在饱和湿度、5% CO₂培养箱中预培养,培养基为DMEM/F12培养液和10%无内毒素的胎牛血清(Gibco公司)。细胞悬液以 5×10^4 个/ml的浓度接种,每孔100 μ

1。

[0032] 二、细胞炎性反应诱导：细胞接种培养24小时后，弃去培养板中的细胞代谢液。将细菌内毒素LPS(O111:B4, Sigma公司)用新鲜DMEM/F12培养液溶解配置成1 μg/ml的浓度，并加入到除A1、A2、B1和C1四个孔之外的所有各孔中，100 μl/孔；A1、A2、B1和C1四个孔中继续加入正常培养液。将细胞培养板置于饱和湿度、5% CO₂培养箱中继续培养。

[0033] 三、药物处理细胞：将无菌的中药提取物用DMEM/F12细胞培养液稀释成2g/ml得到药物培养液，然后用多道移液枪以100 μl/孔的体积将药物培养液加入到所有药物处理细胞孔中。每种药物至少设置3个复孔。阴性对照孔A1、A2、B1、C1和模型对照孔A3、A4、D1、E1全部加入正常培养液。之后将微孔板置于饱和湿度、5% CO₂培养箱中继续培养。

[0034] 四、细胞及其蛋白质固定：药物处理细胞24h时，取出细胞培养板，弃去代谢液，将10%的三氯醋酸固定液加入到微孔中，每孔100 μl，将微孔板置于4℃下静置2h。

[0035] 五、封闭：取出微孔板，弃去固定液，用TBST溶液洗涤微孔板3次，每次3min，然后加入5%脱脂奶粉溶液(BD公司，TBST配制)，100μl/孔，于室温下在摇床上缓慢摇动1h。在此条件下能很好的完成封闭。

[0036] 六、抗体结合：取100μl异硫氰酸荧光素标记的乳铁蛋白抗体(Anti-Lactoferrin antibody-FITC)溶液(5%脱脂奶粉溶液配制，乳铁蛋白抗体工作浓度为1-2 μg/ml。抗体可商业购得，如美国Abcam公司)分别加入到所有微孔当中，然后避光保存于4℃，8h或在室温下缓慢晃动2h。

[0037] 七、抗体结合完毕后，可用多道移液枪回收抗体，或者弃去抗体溶液，然后用TBST缓冲液洗涤微孔板3次，3min/次。

[0038] 八、读数与计算：将微孔板放入全波段酶标仪，设定激发光波长496nm，吸收光波长518nm，进行双波段干涉读取每一个微孔中的荧光吸收值。将同一药物处理复孔的光吸收总值(X)代入以下公式计算出药物的抗炎活性比值(Y)。

$$[0039] \quad Y = \frac{n(P - N)}{4X}$$

[0040] n为药物处理的复孔数；P为LPS处理孔的光吸收值总和(即OD_{A3}+OD_{A4}+OD_{D1}+OD_{E1})；N为空白对照组各孔光吸收值总和(即OD_{A1}+OD_{A2}+OD_{B1}+OD_{C1})。

[0041] 九、计算结果判断：当Y ≥ 1时，则判断药物无抗奶牛子宫内膜炎活性；当Y < 1时，则判断药物有抗奶牛子宫内膜炎活性；当Y ≤ 0.5时，则判断药物有显著抗奶牛子宫内膜炎活性。

[0042] 实施例2

[0043] 本实施例用荧光免疫印迹法对本发明的理论(在奶牛发生子宫内膜炎后，子宫内膜组织细胞中乳铁蛋白(Lactoferrin)表达极显著升高，且抗炎药物对该蛋白的表达量具有显著的下调作用)进行验证：

[0044] 奶牛子宫内膜上皮细胞培养、炎性反应诱导以及药物干预过程与本发明中方法一致。经过处理的细胞以常规方法提取总蛋白后，经聚丙烯酰胺凝胶电泳、半干转印，以荧光素标记的乳铁蛋白抗体(Anti-Lactoferrin antibody-FITC，购自美国Abcam公司)进行免疫印迹检测，以胶片曝光法获取结果，结果参见图2。图中1为正常无炎症反应时细胞中乳铁蛋白的表达量，3为炎症反应时细胞中乳铁蛋白的表达量，2为抗炎药物干预后细胞中乳铁

蛋白的表达量。

[0045] 由图2可以看出,细胞在炎症反应时乳铁蛋白表达量极显著增高,而抗奶牛子宫内膜炎中药穿心莲干预后其表达量显著降低。说明乳铁蛋白的表达量与细胞炎性反应具有高度相关性,抗奶牛子宫内膜炎药物对炎性细胞中高表达的乳铁蛋白具有显著的下调作用。

[0046] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

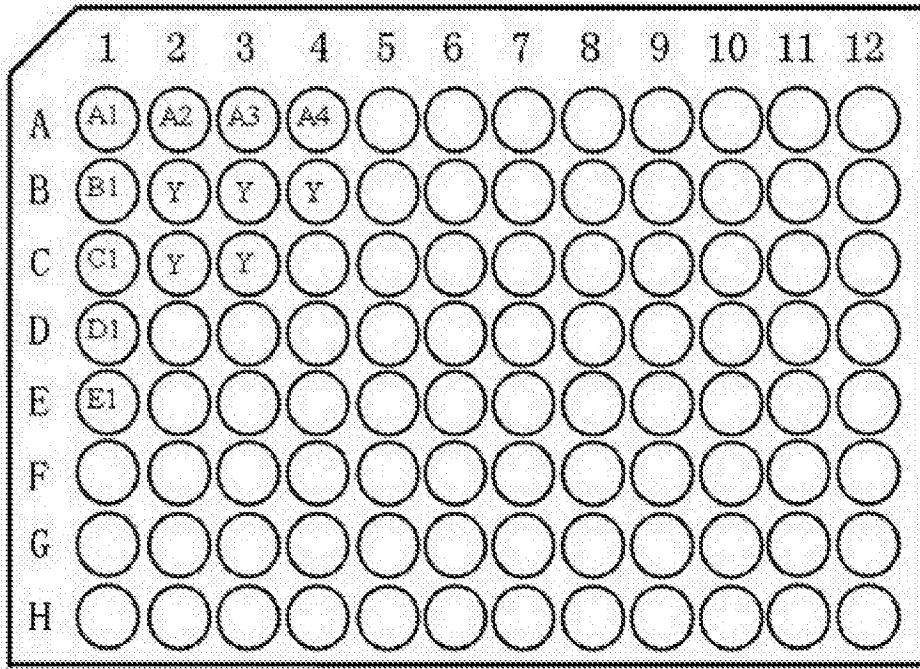


图1

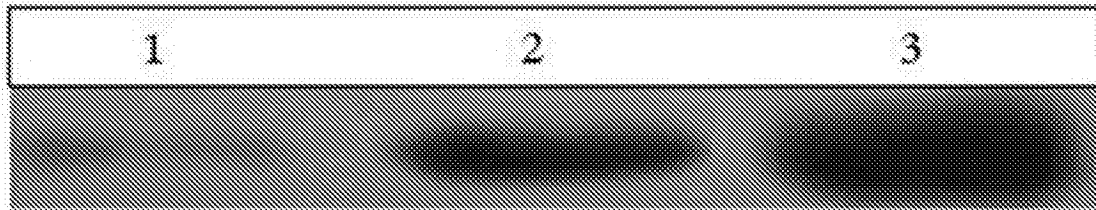


图2