



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102653782 A

(43) 申请公布日 2012.09.05

(21) 申请号 201110048040.X

(22) 申请日 2011.03.01

(71) 申请人 广西壮族自治区药用植物园

地址 530023 广西壮族自治区南宁市长堙路
189号广西药用植物园

(72) 发明人 李力 马志永 缪剑华 邱亚峰

徐永莉 彭丽娜 袁经权 沈阳
谷颖乐 史子学 邵东华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

抗感染中药成分的筛选方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及对抗感染中药成分的筛选方法。本发明的筛选方法是选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药,试验用细胞的准备,To11样受体及其下游信号分子基因的调取,MTT 药物毒性试验,Real-TimePCR 检测中药对To11样受体分子在mRNA水平上的影响,报告基因转录活性检测,验证mTLR9介导的信号通路对下游转录因子NF-κB转录活性的影响。本发明的有益效果:对中医药现代化具有重要的理论价值,有助于抗感染中药的筛选开发中药新药产品,为进一步研究mTLR9的信号转导的分子机制及其介导的生物学功能奠定了基础。

1. 一种抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于筛选方法包括以下步骤:
 - (1) 选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药;
 - (2) 试验用细胞的准备;
 - (3) Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 及其下游信号分子基因的调取;
 - (4) MTT 药物毒性试验;
 - (5) Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响;
 - (6) Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响;
 - (7) Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响;
 - (8) Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达;
 - (9) 报告基因转录活性检测。
2. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:首先选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药,将其用 DMSO 溶解,其储存液终浓度为 20mg/ml。
3. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:试验用细胞的准备,将试验用 Ana-1 小鼠巨噬细胞株,RAW264.7 小鼠巨噬细胞白血病细胞株,293T 人胚肾细胞株分别用含 10% FBS 的 1640 和 DMEM 培养基 (100U/ml 青霉素、链霉素),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂, 培养箱培养,2-3 天细胞处于对数生长期时传代培养。
4. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:选择 Toll 样受体分子和 Toll 样受体的下游分子 MyD88 和 TRIF 以及 IL-6、TNF- α 和 INF- β 作为待检分子,并分别对其部分基因序列进行了引物的设计、合成与鉴定,为 Real-Time PCR 做准备。
5. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:MTT 药物毒性试验,Ana-1 细胞铺 95 孔板,10⁴ 个细胞 / 孔 (200ul),试验设中药感染组,DMSO 阴性对照组,调零组,每组设 6 个感染剂量梯度 (即 80ug/ml,60ug/ml,40ug/ml,20ug/ml,10ug/ml,5ug/ml),每个梯度设 3 个重复,待药物感染细胞 24 小时后,每孔加入 5mg/ml 的 MTT20ul,于 37 $^{\circ}$ C 反应 4 小时后,每孔加入 150ul 的 DMSO 溶解活细胞与 MTT 反应后产生的紫色结晶,于振荡 10 分钟待结晶完全溶解后选择 570nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,得出药物浓度对细胞的抑制率,确定中药感染细胞的最佳剂量。
6. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:初筛中药,通过 Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响、Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达,筛选出经该中药刺激后具有高表达的中药品种。
7. 根据权利要求 1 所述的抗感染中药成分的筛选方法,其特征在于:利用双荧光素酶报告基因系统测定中药刺激 Toll 样受体后对其下游 NF- κ B 和 INF 报告基因转录活性的影响。

抗感染中药成分的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及对抗感染中药成分的筛选方法。

背景技术

[0002] 免疫系统的基本功能是识别外源抗原并诱导机体产生一系列反应清除外源致病性物质,以保持机体的稳定。机体对病毒和细菌的初次免疫应答一般认为是非特异性的,然而 TLR 的发现彻底改变了这一看法。美国免疫学家 Janeway 等将天然免疫细胞所识别的主要靶分子称之为病原相关的分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), PAMPs 是众多微生物共有的一种保守的模式分子,广泛存在于病原体细胞表面,如内毒素、肤聚糖、鞭毛蛋白、双链 RNA 以及酵母细胞壁上的甘露糖等,识别 PAMPs 的受体称为模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs)。

[0003] Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类重要的模式识别受体 (PRRs), Toll 样受体广泛存在于昆虫、脊椎动物和植物中,通过识别病原微生物特定的病原相关分子模 (PAMPs),启动天然免疫应答,构成机体抵抗病原微生物入侵的第一道防线。至今,共发现了 11 种人 TLRs 和 13 种小鼠 TLRs,它们分别选择性识别各种不同的 PAMPs,并介导激活核因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 和 MARKS 等信号通路。Toll 样受体特异性结合自身配体后,通过 MyD88 (髓样分化因子) 依赖性或非依赖性途径 (TRIF) 激活下游一系列蛋白级联反应,诱导相应的白细胞介素 (IL)、肿瘤坏死因子 (TNF) 以及干扰素 (IFN) 等因子的合成与释放,启动机体抗感染免疫反应。因此,TLRs 不仅构成机体抗感染免疫的“第一道防线”,在启动早期天然免疫应答中起重要作用,更成为联系天然免疫和获得性免疫的“桥梁”,对获得性免疫的发生和发生类型具有重要的调控作用。如上所述,Toll 样受体在机体抗感染防御反应中的地位至关重要,而现有的研究表明,许多中药可通过多种途径或环节提高机体抗感染免疫力。由此推测中药提高机体免疫系统对病原体的识别和杀伤能力,以及诱导、调节更有效的免疫防御反应,与 Toll 样受体及其相关的信号分子密切相关,二者之间必然存在着天然的联系。研究抗感染中药对 Toll 样受体活性及其下游信号分子的影响,评价 Toll 样受体作为筛选抗感染中药的靶标分子的应用价值,并建立以 Toll 样受体为靶标的筛选抗感染中药的细胞模型。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种抗感染中药成分的筛选方法。本发明所提供的技术方案是:

[0005] 本发明的筛选方法是:

[0006] (1) 首先选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药,将其用 DMSO 溶解,其储存液终浓度为 20mg/ml。

[0007] (2) 试验用细胞的准备:将试验用 Ana-1 小鼠巨噬细胞株,RAW264.7 小鼠巨噬细胞白血病细胞株,293T 人胚肾细胞株分别用含 10% FBS 的 1640 和 DMEM 培养基 (100U/ml

青霉素、链霉素), 37°C, 5% CO₂, 培养箱培养, 2-3 天细胞处于对数生长期时传代培养。

[0008] (3) Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 及其下游信号分子基因的调取: 选择 Toll 样受体分子和 Toll 样受体的下游分子 MyD88 和 TRIF 以及 IL-6、TNF- α 和 INF- β 作为待检分子, 并分别对其部分基因序列进行了引物的设计、合成与鉴定, 为 Real-Time PCR 做准备。

[0009] (4) MTT 药物毒性试验: Ana-1 细胞铺 96 孔板, 10⁴ 个细胞/孔 (200 μ l), 试验设中药感染组, DMSO 阴性对照组, 调零组, 每组设 6 个感染剂量梯度 (即 80 μ g/ml, 60 μ g/ml, 40 μ g/ml, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml), 每个梯度设 3 个重复, 待药物感染细胞 24 小时后, 每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20 μ l, 于 37°C 反应 4 小时后, 每孔加入 150 μ l 的 DMSO 溶解活细胞与 MTT 反应后产生的紫色结晶, 于振荡 10 分钟待结晶完全溶解后选择 570nm 波长, 在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值, 得出药物浓度对细胞的抑制率, 确定中药感染细胞的最佳剂量。

[0010] (5) Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响: 初筛中药, 通过 Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响、Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达, 筛选出经该中药刺激后具有高表达的中药品种。

[0011] (6) 利用双荧光素酶报告基因系统测定中药刺激 Toll 样受体后对其下游 NF- κ B 和 INF: Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响; Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响; Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达。

[0012] (7) 报告基因转录活性检测, 验证 mTLR9 介导的信号通路对下游转录因子 NF- κ B 转录活性的影响。

[0013] 本发明的有益效果: 对中医药现代化具有重要的理论价值, 有助于抗感染中药的筛选开发中药新药产品, 为进一步研究 mTLR9 的信号转导的分子机制及其介导的生物学功能奠定了基础。

实施例

[0014] (1) 选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药, 如甘草次酸、淫羊藿苷、黄芩苷、苦参碱、穿心莲内酯, 分别用 DMSO 溶解, 其储存液终浓度为 20mg/ml。

[0015] (2) 试验用细胞的准备: 将试验用 Ana-1 小鼠巨噬细胞株, RAW264.7 小鼠巨噬细胞白血病细胞株, 293T 人胚肾细胞株 (均来自中科院上海细胞生物研究所细胞库) 分别用含 10% FBS 的 1640 和 DMEM 培养基 (100U/ml 青霉素、链霉素), 37°C, 5% CO₂, 培养箱培养, 2-3 天细胞处于对数生长期时传代培养。

[0016] (3) Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 及其下游信号分子基因的调取: 选择 Toll 样受体 (TLR2、3、4、7、9) 共计 5 个 Toll 样受体分子和 Toll 样受体的下游分子 MyD88 和 TRIF 以及 IL-6、TNF- α 和 INF- β 作为待检分子, 并分别对其部分基因序列进行了引物的设计、合成与鉴定, 为 Real-Time PCR 做准备。

[0017] (4) MTT 药物毒性试验: Ana-1 细胞铺 96 孔板, 10⁴ 个细胞/孔 (200 μ l), 试验设中药感染组, DMSO 阴性对照组, 调零组, 每组设 6 个感染剂量梯度 (即 80 μ g/ml, 60 μ g/ml, 40 μ g/

ml, 20ug/ml, 10ug/ml, 5ug/ml), 每个梯度设 3 个重复, 待药物感染细胞 24 小时后, 每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20ul, 于 37°C 反应 4 小时后, 每孔加入 150ul 的 DMSO 溶解活细胞与 MTT 反应后产生的紫色结晶, 于振荡 10 分钟待结晶完全溶解后选择 570nm 波长, 在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值, 得出药物浓度对细胞的抑制率, 确定中药感染细胞的最佳剂量。

[0018] (5) Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响: 初筛中药, 通过 Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响、Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响、Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达, 筛选出经该中药刺激后具有高表达的中药品种。

[0019] (6) 利用双荧光素酶报告基因系统测定中药刺激 Toll 样受体后对其下游 NF- κ B 和 INF: Real-Time PCR 检测中药对 Toll 样受体分子下游分子 MyD88 和 TRIF 在 mRNA 水平上的影响; Real-Time PCR 检测中药对 IL-6、TNF- α 和 INF- β 等细胞因子的影响; Western Blot 检测 Toll 样受体蛋白的表达。

[0020] (7) 报告基因转录活性检测, 验证 mTLR9 介导的信号通路对下游转录因子 NF- κ B 转录活性的影响。

[0021] 经以上筛选结果显示, 甘草次酸、淫羊藿苷能够明显提高 MyD88 和 TRIF 的 mRNA 的水平, 显著提高 IL-6 的 mRNA 的水平。

专利名称(译)	抗感染中药成分的筛选方法		
公开(公告)号	CN102653782A	公开(公告)日	2012-09-05
申请号	CN201110048040.X	申请日	2011-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区药用植物园		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区药用植物园		
[标]发明人	李力 马志永 缪剑华 邱亚峰 徐永莉 彭丽娜 袁经权 沈阳 谷颖乐 史子学 邵东华		
发明人	李力 马志永 缪剑华 邱亚峰 徐永莉 彭丽娜 袁经权 沈阳 谷颖乐 史子学 邵东华		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/66 C12Q1/02 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及对抗感染中药成分的筛选方法。本发明的筛选方法是选取具有抗病毒、细菌、增强免疫活性的中药，试验用细胞的准备，Toll样受体及其下游信号分子基因的调取，MTT药物毒性试验，Real-TimePCR检测中药对Toll样受体分子在mRNA水平上的影响，报告基因转录活性检测，验证mTLR9介导的信号通路对下游转录因子NF-κB转录活性的影响。本发明的有益效果：对中医药现代化具有重要的理论价值，有助于抗感染中药的筛选开发中药新药产品，为进一步研究mTLR9的信号转导的分子机制及其介导的生物学功能奠定了基础。