

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610016196.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 28 日

[11] 公开号 CN 1936583A

[22] 申请日 2006.10.23

[21] 申请号 200610016196.9

[71] 申请人 中国人民武装警察部队医学院

地址 300162 天津市河东区成林路

[72] 发明人 杨 磊 呼文亮 陈立军 王洪敏
牟心红 靳秋月 姚 丽 锁江蕊
谢 红 王瑞岷 王 玮 程世翔
樊 嵘

[74] 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司
代理人 江增俊

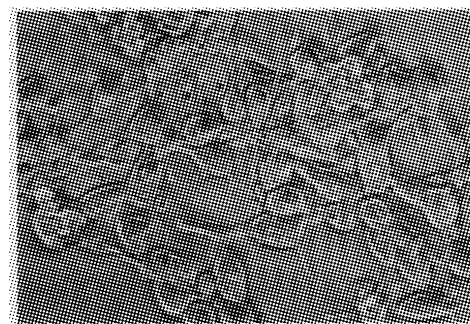
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称

应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法

[57] 摘要

本发明是一种应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法，属于分子生物学领域，本方法利用特异性靶蛋白 AR、通过癌细胞生长情况和凋亡率检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用，其检测结果证明是准确的，同时，也能证明免疫印迹技术在本方法中的具体应用也是可靠的。该方法具有简单和易于推广应用的突出优点。



1.一种应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法，其特征在于由以下步骤组成：

(1) 由姜黄素处理 LNCap 细胞，显微镜下观察细胞形态变化；MTT 法检测 LNCap 细胞生长情况；流式细胞技术 FCM 检测细胞凋亡率；

(2) 用免疫印迹 Western-blotting 技术检测雄激素受体蛋白 AR 的表达：

①由姜黄素处理的前列腺癌雄激素依赖性细胞至少 24h 后收集，用 PBS 洗涤三次后加入细胞裂解液，细胞裂解后离心取上清液，沸水浴蛋白变性后 Bradford 蛋白定量测定蛋白浓度，其合适浓度范围为 $0.5-2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；

②裂解后所得细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，经电泳后的凝胶于 60mA 恒流转移，将蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜，选用可复性丽春红染液振荡染色，并根据蛋白质 Marker 比较条带分子量大小去除非特异性条带，先后加入一抗和二抗后，用 ECL 荧光 western-blotting 试剂盒显色，显影、定影。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于特异性裂解液的组分及其浓度为：

甘油 108 mmol/L，曲拉通 (TritonX-100) 150mmol/L，氯化钠 (NaCl) 137mmol/L，氟化钠 (NaF) 10mmol/L，乙二醇双(a-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA) 1mmol/L，乙二胺四乙酸 (EDTA) 5mmol/L，焦磷酸钠 1mmol/L，三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (Tris-HCl) 20mmol/L，原硫酸钠 1mmol/L，SDS 3.7mmol/L，苯甲基磺酰氟 (PMSF) 1mmol/L， β -磷酸甘油：100mmol/L，抑肽酶 3.6mmol/L，二硫苏糖醇 DTT (DTT)：2.8mmol/L，溴酚蓝：1.5 mmol/L。

应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法

技术领域

本发明属于分子生物学领域，尤其是一种应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法。

背景技术

前列腺癌是男性死亡率较高的一种恶性肿瘤，雄激素及其受体在前列腺癌的发生发展过程中发挥重要作用。前列腺癌与前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)关系密切，多数前列腺癌患者无论早期或晚期均有PSA持续表达，高度表达者占90%以上，因此PSA已作为前列腺癌临床诊断和治疗监测的敏感指标之一。PSA的表达受雄激素调节，雄激素进入前列腺上皮细胞后首先与细胞核内雄激素受体蛋白(androgen receptor, AR)结合，引起AR构象改变，随后AR与热休克蛋白解离，受体磷酸化形成二聚体，二聚体与PSA启动子中雄激素应答元件(ARE)结合，诱导PSA基因的转录表达。有些物质可调节AR的表达，例如生长因子使AR增加五倍等。有研究发现雄激素非依赖的前列腺癌中AR同样是非常重要的分子，其作用有待进一步研究。

通过以上分析可知，利用诱导PSA基因转录表达的AR作为特异性靶蛋白来检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用将具有突出的实际意义，申请人目前还没有发现通过特异性靶蛋白定向检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的具体方法。

发明内容

本发明的目的是提供一种应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法，该方法具有精确度高、适用性广、特异性强的优点。

本发明应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法由以下步骤组成：

(1) 由姜黄素处理LNCap细胞，显微镜下观察细胞形态变化并进行图像采集；MTT法检测LNCap细胞生长情况；流式细胞技术FCM检测细胞凋亡率；

(2) 用免疫印迹Western-blotting技术检测雄激素受体AR的表达：

①由姜黄素处理的前列腺癌雄激素依赖性细胞至少24h后收集，用PBS洗涤三次后加入细胞裂解液，细胞裂解后离心取上清液，沸水浴蛋白变性后Bradford蛋白定量测定蛋白浓度，其合适浓度范围为0.5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；

②裂解后所得细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳，经电泳后的凝胶于60mA

恒流转移,将蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜,选用可复性丽春红染液振荡染色,并根据蛋白质 Marker 比较条带分子量大小去除非特异性条带,先后加入一抗和二抗后,用 ECL 荧光 western-blotting 试剂盒显色,显影、定影。

所述的特异性裂解液的组分及其浓度为:甘油 108 mmol/L,曲拉通 (TritonX-100) 150mmol/L,氯化钠 137mmol/L,氟化钠 10mmol/L,乙二醇双(a-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA) 1mmol/L,乙二胺四乙酸(EDTA) 5mmol/L,焦磷酸钠 1mmol/L,三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl) 20mmol/L,原硫酸钠 1mmol/L,SDS 3.7mmol/L,苯甲基磺酰氟(PMSF) 1mmol/L, β -磷酸甘油 100mmol/L,抑肽酶 3.6mmol/L,二硫苏糖醇(DTT) 2.8mmol/L,溴酚蓝 1.5 mmol/L。

本发明的优点和有益效果是:

1. 本发明所公开的一种应用特异性靶蛋白定向检测姜黄素对前列腺癌雄激素依赖性 LNCaP 细胞是否有抑制作用的方法,其结果证明该方法利用特异性靶蛋白 AR、通过癌细胞生长情况和凋亡率检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用是准确的。同时,也能证明免疫印迹技术在本方法中的具体应用也是可靠的。

2. 本发明的方法具有简单和易于推广应用的突出优点。

附图说明

附图 1 LNCap 细胞原形态特征照片。

附图 2 经姜黄素处理后的 LNCap 细胞形态特征照片。

附图 3 MTT 法测定细胞存活率统计图。

附图 4 western blotting 法测定 LNCap 细胞 AR 的表达结果照片。

附图 5 western blotting 法测定 LNCap 细胞常规蛋白(β -actin)结果照片。

具体实施方式

下面结合具体实施例进一步阐述本发明。

应当理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明要求保护的范 围,下列实施例中未注明具体实验条件和方法,通常按照常规条件如: J. 萨姆布鲁克等主编,科学出版社,1992,分子克隆实验指南(第二版); D. L. 斯佩克特等,科学出版社,2001,细胞实验指南;吕鸿声,科学出版社,1982,或按照制造厂商所建议的条件。

实施例:

一、细胞培养

LNCap 细胞在 37° C, 5%CO₂ 条件下培养,培养基为 RPMI-1640,含 10%

新生牛血清及青霉素、链霉素各 100U/ml，其形态特征如图 1 照片所示。

二、姜黄素对 LNCap 细胞形态的影响

以五种浓度的姜黄素分组进行以下操作：在生长对数期的 LNCap 细胞中分别加入浓度为 0 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、30 μ mol/L、40 μ mol/L 的姜黄素，并分别于 0h、12h、24h、48h 倒置显微镜下观察 LNCap 细胞形态，激光扫描共聚焦显微镜摄像系统对各实验组细胞形态进行图像采集，其中姜黄素浓度 40 μ mol/L 组 24 h 后细胞形态照片如图 2 所示。

图 2 所示照片与图 1 对照组比较，在显微镜下清楚显示 LNCap 细胞形态有明显的变化，部分细胞出现凋亡征象，表现为细胞收缩变圆，胞体变小，与周围失去联系，胞膜形成泡状突起，胞质收缩，有典型凋亡小体存在。

三、MTT 法测细胞生长曲线

LNCap 细胞以 3.0×10^4 个孔密度接种于 96 孔细胞培养板中，37℃ 5%CO₂ 培养箱培养，0 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、30 μ mol/L、40 μ mol/L 不同浓度的姜黄素分别处理 12h、24h、36h、48h 终止培养，终止培养前 4h 加入 5mg/mL MTT 10 μ l，终浓度为 0.5mg/mL，4h 后弃上清液，DMSO 溶解 MTT 结晶，用 Biotek Microplate EJ309 酶标测定仪测 OD 值，检测波长 570nm，参考波长为 630nm，各组每次测 12 孔，重复三次取均值，以下式计算细胞相对存活率：

细胞相对存活率%=(OD 实验组/OD 对照组)×100% (以空白组 OD 值调零)
结果进行统计学分析。各组实验均重复 3 次。

MTT 法测的 LNCap 细胞的存活率，结果如图 3 所示，从图中可以看出 10~40 μ mol/L 的姜黄素都能够抑制细胞的增殖和生长，并且在 0h 以上都有抑制作用，其中 40 μ mol/L 作用 24h 最强，细胞存活率为对照组的 40%。说明 40 μ mol/L 的姜黄素最具临床意义。

四、FCM 测细胞生长周期

分别以浓度为 0 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、30 μ mol/L、40 μ mol/L 的姜黄素处理 LNCaP 细胞 24h 后收集，1000r/m 离心 10min，PBS 洗涤，70%乙醇 4℃固定过夜，保存于 4℃备用；LNCaP 细胞同法洗两次，500 目铜网过滤，离心，加 PI(碘化丙啶 propidium iodide)染色液，4℃避光过夜。流式细胞仪测定 DNA 荧光强度及散射光参数，激发光波长 488nm，并用凋亡软件测定细胞凋亡率及细胞周期分布。

姜黄素可诱导 LNCap 细胞凋亡，浓度为 0、10、20、30、40 μ mol/L 姜黄素作用细胞的凋亡率分别为 1.20%、1.22%、2.22%、3.69%和 9.23%。其中 40 μ mol/L 姜黄素效果最显著，10、20 μ mol/L 姜黄素作用不明显，30 μ mol/L 姜黄素效果优于 10、20 μ mol/L 的姜黄素。

五、免疫印迹 western blotting 检测雄激素受体 AR 的表达

(1) 以浓度为 $0\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $30\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素分别处理 LNCap 细胞, 24h 后收集细胞, PBS 洗涤, 用以下组分和重量的裂解液裂解细胞, 裂解液组成是: 甘油 108mmol/L , 曲拉通 (TritonX-100) 150mmol/L , 氯化钠 (NaCl) 137mmol/L , 氟化钠 (NaF) 10mmol/L , 乙二醇双(a-氨基乙基)醚四乙酸 (EGTA) 1mmol/L , 乙二胺四乙酸 (EDTA) 5mmol/L , 焦磷酸钠 1mmol/L , 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (Tris-HCl) 20mmol/L , 原硫酸钠 1mmol/L , SDS 3.7mmol/L , 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 1mmol/L , β -磷酸甘油: 100mmol/L , 抑肽酶 3.6mmol/L , 二硫苏糖醇 DTT (DTT): 2.8mmol/L , 溴酚蓝: 1.5mmol/L 。

裂解细胞后离心取上清液, 沸水浴蛋白变性后用 Bradford 蛋白定量测定试剂初步测定蛋白浓度, 浓度为 $1.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

(2) 上述所得细胞总蛋白作 SDS-PAGE 电泳分析: 配制 8% 的分离胶 10ml , 灌胶后, 用 0.1% SDS 封胶, 并静置 30min, 使其完全聚合; 倾出 SDS 溶液, 用双蒸水将未聚合的分离胶冲除, 反复数次后, 用滤纸吸净; 配制 4% 的浓缩胶 5ml 插号梳子后灌胶, 静置 30min 后, 加入电泳缓冲液 (running buffer: Tris-base 15.1g , Glycine 94g , SDS 5.0g , 溶解于双蒸水中定容至 1000ml), 并将加样孔中未聚合的浓缩胶冲除; 每加样孔中加入蛋白质样品 $30\mu\text{g}$, 在 100V 电压下进行电泳; 取胶做考马斯亮蓝染色 45min, 脱色液过夜脱色, 扫描凝胶保存结果。

(3) 经 SDS-PAGE 电泳后的凝胶于 60mA 恒流进行转移, 转移时间: 常规蛋白 β -actin 为 45min, AR 为 1.5h, 将蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜上, 具体过程为:

将分离胶从电泳仪上剥离, 放在事先用电泳缓冲液 [三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base): 5.8g , 甘氨酸 (Glycine): 2.9g , 十二烷基硫酸钠 (SDS): 0.37g , 甲醇 200ml 溶解于双蒸水中定容至 1000ml] 浸润的滤纸上, 并依次覆盖硝酸纤维素膜和滤纸, 然后用电泳缓冲液彻底浸润并去除气泡; 将处理后的分离胶和硝酸纤维素膜放入电转移槽中, 以 100V 电压转移 1h; 电转移结束后, 可用丽春红染液振荡染色 4~5min, 取出硝酸纤维素膜, 用蒸馏水洗净观察, 去除非特异条带。

待蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 先用 TBST (一种混合洗液: T 表示三羟甲基氨基甲烷, B 表示盐酸, S 表示氯化钠, T 表示吐温-20) 将膜洗净, 再用 TBST 配制的含 5% 的脱脂牛奶封闭 1h; 取出膜, 将膜放入工作液中振荡杂交 2~3h, 工作液由 TBST、脱脂牛奶、鼠抗人 AR 单抗和鼠抗人 β -actin 抗体混合组成, 其重量比为 1000: 5: 1: 0.5。吸去含一抗的工作液后, 再用 TBST 洗涤硝酸纤维素膜三次, 每次 10min, 以去除多余的一抗; 之后将膜放

入另一工作液中振荡杂交 1 h, 工作液由 TBST、脱脂牛奶和含山羊抗小鼠 IgG 组成, 其重量比为 2000: 5: 1。吸去含二抗的工作液后, 再用 TBST 洗涤硝酸纤维素膜三次, 每次 10min, 以去除多余的二抗; 用 PBS 洗涤液(Na_2HPO_4 : 1.15g/L, KH_2PO_4 : 0.2g/L, NaCl: 8g/L, KCl: 0.2g/L, PH: 7.4)浸泡、洗膜 2~3 min, 去除 TBST 中吐温-20 (Tween-20) 对荧光反应的影响。

(4) 化学发光加强 ECL 系统 Western-blotting 试剂盒显色

剪取一张保鲜膜, 将 TBST 洗涤过的硝酸纤维素膜放在保鲜膜上。将试剂盒中放射性免疫荧光试剂鲁米钠溶液 A (Luminol Reagent SolutionA) 与放射性免疫荧光试剂鲁米钠溶液 B (Luminol Reagent SolutionB) 等比例混匀, 按照 $0.125\text{ml}/\text{cm}^2$ 均匀铺在膜的蛋白面, 室温下反应 1min 后, 将保鲜膜折叠, 连同靶蛋白膜带入暗室进行包括感光、显影、定影等操作。

分别以不同浓度的姜黄素处理 LNCap 细胞 24h 后, Western-blot 检测 AR 表达, 结果见图 4。图 4 中 AR 蛋白免疫印迹条带从左到右依次是经过浓度为 $40\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $30\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $20\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $0\mu\text{mol}/\text{L}$ 的姜黄素处理 LNCap 细胞的结果。图 4 清楚显示, 姜黄素可抑制 AR 的表达, 并且对 AR 表达的抑制程度依赖于姜黄素的浓度, 其中姜黄素浓度为 $40\mu\text{mol}/\text{L}$ 时抑制效果最好。

图 5 是 western blotting 法测定 LNCap 细胞常规蛋白 β -actin 结果照片, 说明不同浓度的姜黄素对 LNCap 细胞常规蛋白 β -actin 没有影响。

上述实施例中姜黄素剂量范围为 $0\sim 50\mu\text{mol}/\text{L}$, $50\mu\text{mol}/\text{L}$ 为最大非毒性剂量, 以上剂量范围对检测结果没有影响。

上述实施例中, 姜黄素(Curcumin)购自 Sigma 公司, 前列腺癌细胞 LNCap, 由本申请人单位保存。ECL 系统 western-blotting 试剂盒购于北京中山生物公司, 硝酸纤维素膜购自北京鼎国生物技术发展中心, AR 单克隆抗体 (鼠抗人) 辣根过氧化酶标记的抗体 (羊抗鼠) 购自北京中山公司。

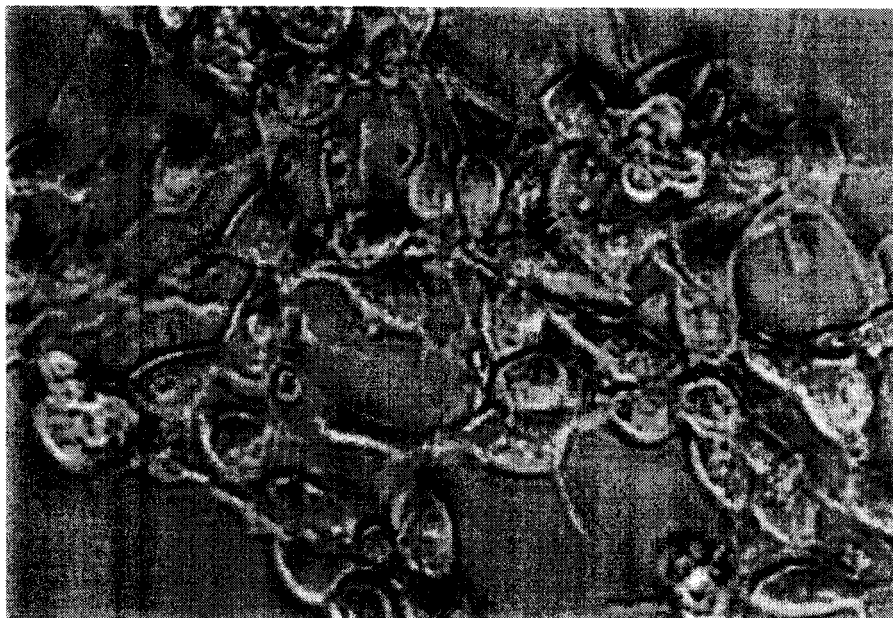


图 1

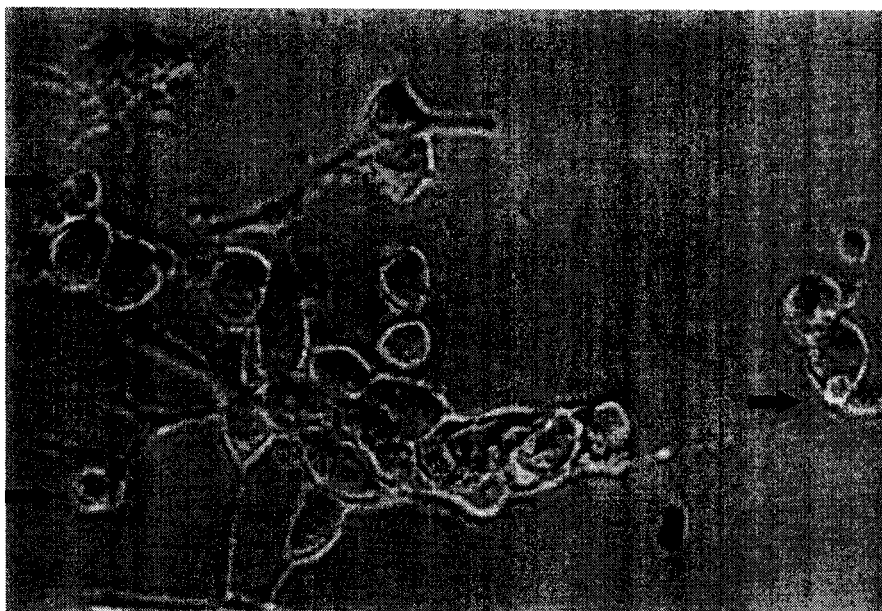


图 2

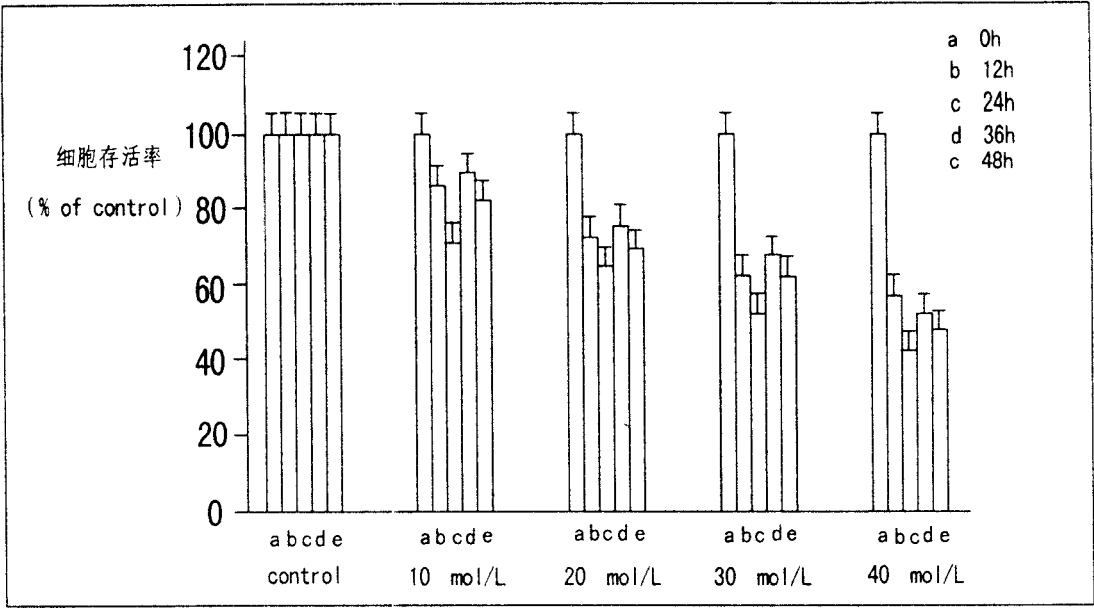


图 3



图 4



图 5

专利名称(译)	应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法		
公开(公告)号	CN1936583A	公开(公告)日	2007-03-28
申请号	CN200610016196.9	申请日	2006-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民武装警察部队医学院		
申请(专利权)人(译)	中国人民武装警察部队医学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民武装警察部队医学院		
[标]发明人	杨磊 呼文亮 陈立军 王洪敏 牟心红 靳秋月 姚丽 锁江蕊 谢红 王瑞岷 王玮 程世翔 樊嵘		
发明人	杨磊 呼文亮 陈立军 王洪敏 牟心红 靳秋月 姚丽 锁江蕊 谢红 王瑞岷 王玮 程世翔 樊嵘		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531 G01N33/15		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种应用特异性靶蛋白检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用的方法，属于分子生物学领域，本方法利用特异性靶蛋白AR、通过癌细胞生长情况和凋亡率检测姜黄素对前列腺癌细胞抑制作用，其检测结果证明是准确的，同时，也能证明免疫印迹技术在本方法中的具体应用也是可靠的。该方法具有简单和易于推广应用的突出优点。

