



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109055476 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810918855.0

(22)申请日 2018.08.07

(71)申请人 河南大学

地址 475004 河南省开封市金明大道河南
大学基础医学院

(72)发明人 吴东栋 田文柯 李见梅 张倩倩
李彦章 陈明亮 王红钢 王慧娟
张磊

(51)Int.Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物治疗效果分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物治疗效果分析方法,包括以下步骤:
S1、将人甲状腺癌细胞中的TT、TPC-1、ARO细胞分别分为阴性对照组、P6肽组、P9肽组、P6+P9肽组和P11肽组;S2、其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 μmol/L P6肽,200 μmol/L P9肽,200 μmol/L P6+P9肽,200 μmol/L P11肽,继续培养24h;S3、通过蛋白免疫印迹(Western blot)法、MTS法、EDU法检测发现,加入200 μmol/L的P11肽的抑制细胞生长作用较其他组都强;S4、通过划痕、迁移(Transwell法)及侵袭(Invasion法)实验检测发现,加入200 μmol/L的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,显示出比其他组更强的抑制细胞迁移和侵袭的能力;S5、通过裸鼠移植瘤实验表明,P11肽具有比其它给药组更强的抑制人甲状腺癌生长的作用。

1. 一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将人甲状腺癌细胞中的TT、TPC-1、ARO细胞分别分为阴性对照组、P6肽组、P9肽组、P6+P9肽组和P11肽组,每种细胞共5组;

S2、待细胞生长至对数生长期,各组更换为无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 μ mol/L P6肽,200 μ mol/L P9肽,200 μ mol/L P6+P9肽,200 μ mol/L P11肽,继续培养24h;

S3、通过MTS法、EDU法、蛋白免疫印迹(Western blot)法检测发现,加入200 μ mol/L的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,抑制细胞生长作用较其他组都强;

S4、通过划痕、迁移(Transwell法)及侵袭(Invasion法)实验检测发现,加入200 μ mol/L的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,显示出比其他组更强的抑制细胞迁移和侵袭的能力;

S5、通过裸鼠移植瘤实验表明,P11肽具有比其它给药组更强的抑制人甲状腺癌生长的作用。

2. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述S3中的EDU法的具体过程为(1)EDU标记(24孔板操作):用细胞培养基按1000:1的比例稀释EDU溶液(试剂A),制备适量50 μ M EDU培养基;每孔加入300 μ L 50 μ M EDU培养基孵育2h,弃培养基,PBS清洗细胞2次,每次5min;(2)细胞固定:每孔加入150 μ L细胞固定液(即含4%多聚甲醛的PBS)室温孵育30min,弃固定液,每孔加入150 μ L 2mg/mL甘氨酸,脱色摇床孵育5min,弃甘氨酸溶液,每孔加入300 μ L PBS,清洗1次,5min,弃PBS,(加强)每孔加入100 μ L渗透剂(0.5% Triton-X100的PBS)脱色摇床孵育10min,PBS清洗1次,5min;(3)Apollo染色:每孔加入300 μ L的1 \times Apollo染色反应液(一定要按顺序配,现用现配,30min用完),避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液,加入300 μ L渗透剂(0.5% Triton-X100的PBS)脱色摇床清洗2次,每次10min,弃渗透剂,(加强)每孔每次加入300 μ L甲醇清洗1-2次,每次5min,PBS洗1次,每次5min;(4)DNA染色:用去离子水按100:1的比例稀释试剂F,制备适量1 \times Hoechst33342反应液,避光保存,每孔加入300 μ L 1 \times Hoechst33342反应液,避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液,每孔每次加入300 μ L PBS洗3次,每次5min,每孔加300 μ L PBS保存,拍照,计数细胞增殖率。

3. 根据权利要求2所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述Apollo染色反应液配制1.5mL的配方为去离子水(A) 1407 μ L、Apollo反应缓冲液(B) 75 μ L、Apollo催化剂溶液(C) 15 μ L、Apollo荧光染料溶液(D) 4.5 μ L、Apollo缓冲添加剂(E) 13.5mg。

4. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述S3中的MTS法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至96孔培养板中,接种量为 8×10^3 个/孔,每组设6个副孔,每孔加入100 μ L培养基,在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育,24h后,每孔分别加入10 μ L、5mg/mL的MTS溶液,在培养箱中继续培养2h,然后取出细胞,使用酶标仪在490nm处测定各孔的吸光值,根据吸光值计算细胞活力:细胞活力(% of control) = (药物组A值-调零孔A值) / (对照孔A值-调零孔A值) \times 100%。

5. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,

其特征在于:所述S4中的划痕法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至6孔培养板中,接种量为 5×10^5 个/孔,每孔加入3ml的培养基,培养箱中37℃孵育;待细胞生长至对数生长期,进行划痕操作,划痕结束后用PBS洗3次,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 $\mu\text{mol/L}$ P6肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P6+P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P11肽。0h、12h、24h在100 \times 镜下进行拍照。计算细胞迁移率:细胞迁移率(%) = (划痕0h的距离-划痕24h的距离)/划痕0h的距离 $\times 100\%$ 。

6. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述S4中的迁移(Transwell法)实验的具体过程为将小室置于24孔板中,小室下层加入600 μL 含20%血清的培养基,上层加入200 μL 不含血清的培养基,每孔 4×10^4 个细胞,37℃培养箱内孵育24h,取出培养板,弃去培养基,每孔加75%酒精固定15min,PBS洗2次,结晶紫染色10min,自来水冲洗,将结晶紫洗去,用棉签将小室上层擦干净,用刀片轻轻刮下薄膜放于载玻片上,用中性树胶固定,100 \times 镜下拍照。

7. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述S4中的侵袭(Invasion法)实验的具体过程为将小室置于24孔板中,小室下层加入600 μL 含20%血清的培养基,上层加入200 μL 不含血清的培养基,每孔 8×10^4 个细胞,37℃培养箱内孵育24h,取出培养板,弃去培养基,每孔加75%酒精固定15min,PBS洗2次,结晶紫染色10min,自来水冲洗,将结晶紫洗去,用棉签将小室上层擦干净,用刀片轻轻刮下薄膜放于载玻片上,用中性树胶固定,100 \times 镜下拍照。

8. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述Western blot法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至60mm培养皿中,待细胞生长至对数生长期,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 $\mu\text{mol/L}$ P6肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P6+P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P11肽,培养24h后提取蛋白,采用Western Blot法检测cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达情况。

9. 根据权利要求1所述的一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,其特征在于:所述S5中的裸鼠移植瘤实验的具体过程为将细胞消化计数,用PBS重悬细胞配制成 5×10^6 个/mL的细胞悬液,采用1mL注射器取细胞悬液0.2mL注射于裸鼠右侧腋下,接种后24h,分别将接种有人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO的裸鼠按体重随机分为5组,每组6只:阴性对照组:(生理盐水),P6肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P6肽+P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P11肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),各组均采用皮下注射,给药体积按照0.1mL/10g进行,共给药28天,实验期间裸鼠自由进食和饮水,每日测量裸鼠体重及肿瘤的长(a)短(b)径,并按公式:体积= $\pi/6 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。裸鼠处死后,取出肿瘤并称重,按下列公式计算肿瘤生长抑制率,肿瘤生长抑制率(Inhibition rate, IR) = (1-给药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重) $\times 100\%$,绘制裸鼠肿瘤体积变化曲线、肿瘤重量、抑瘤率、裸鼠体重变化曲线。

一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,具体为一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法。

背景技术

[0002] 甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,近年来其发病率在世界范围内呈明显上升趋势。根据国家癌症中心发布的2018中国癌症报告,甲状腺癌目前位居恶性肿瘤发病的第七位、女性恶性肿瘤发病的第四位,更是30岁以下女性群体的最主要癌症类型。因此,积极进行预防和治疗甲状腺癌具有重要意义和科学价值。

[0003] 目前抗肿瘤肽类药物已经引起了各国学者的高度关注。与大多数小分子抗肿瘤药物相比,抗肿瘤活性肽具有分子质量小、亲和力高、毒性低、易于穿透组织等特点,并可针对肿瘤细胞发生发展的不同环节,特异性地抑制肿瘤细胞的生长,显示出了重要的应用价值。因此,研发具有抗肿瘤活性的肽类药物,将在肿瘤基础研究和临床应用方面发挥重要作用。

[0004] 通过噬菌体展示文库技术已经鉴定出两条活性肽,即P6肽CYYGQSKY C和P9肽LSPPRYP。P6肽可以通过阻断血管生长因子C与其受体血管内皮生长因子受体3结合,从而能够抑制肿瘤细胞迁移与侵袭。P9肽能够阻断碱性成纤维细胞生长因子与成纤维细胞生长因子受体结合,从而抑制肿瘤生长。我们将P6肽与P9肽通过柔性连接子Gly-Gly-Gly (GGG) 连接起来,形成一条新的活性肽CYYGQSKYCGGLSPPRYP,即P11肽。因此,我们提出一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,用于分析肽P11在治疗甲状腺癌的药物中的效果。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种生物活性肽P11在治疗甲状腺癌的药物中效果分析方法,包括以下步骤:

[0007] S1、将人甲状腺癌细胞中的TT、TPC-1、ARO细胞分别分为阴性对照组、P6肽组、P9肽组、P6+P9肽组和P11肽组,每种细胞共5组;

[0008] S2、待细胞生长至对数生长期,各组更换为无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 μ mol/L P6肽,200 μ mol/L P9肽,200 μ mol/L P6+P9肽,200 μ mol/L P11肽,继续培养24h;

[0009] S3、通过MTS法、EDU法、蛋白免疫印迹(Western blot)法检测发现,加入200 μ mol/L的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,抑制细胞生长作用较其他组都强;

[0010] S4、通过划痕、迁移(Transwell法)及侵袭(Invasion法)实验检测发现,加入200 μ mol/L的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,显示出比其他组更强的抑制细胞迁移和侵袭的能力;

[0011] S5、通过裸鼠移植瘤实验表明,P11肽具有比其它给药组更强的抑制人甲状腺癌生

长的作用。

[0012] 优选的,所述S3中的EDU法的具体过程为(1)EDU标记(24孔板操作):用细胞培养基按1000:1的比例稀释EDU溶液(试剂A),制备适量50 μ M EDU培养基;每孔加入300 μ L 50 μ M EDU培养基孵育2h,弃培养基,PBS清洗细胞2次,每次5min;(2)细胞固定:每孔加入150 μ L细胞固定液(即含4%多聚甲醛的PBS)室温孵育30min,弃固定液,每孔加入150 μ L2mg/mL甘氨酸,脱色摇床孵育5min,弃甘氨酸溶液,每孔加入300 μ L PBS,清洗1次,5min,弃PBS,(加强)每孔加入100 μ L渗透剂(0.5%Triton-X100的PBS)脱色摇床孵育10min,PBS清洗1次,5min;(3)Apollo染色:每孔加入300 μ L的1 \times Apollo染色反应液(一定要按顺序配,现用现配,30min用完),避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液,加入300 μ L渗透剂(0.5% Triton-X100的PBS)脱色摇床清洗2次,每次10min,弃渗透剂,(加强)每孔每次加入300 μ L甲醇清洗1-2次,每次5min,PBS洗1次,每次5min;(4)DNA染色:用去离子水按100:1的比例稀释试剂F,制备适量1 \times Hoechst33342反应液,避光保存,每孔加入300 μ L1 \times Hoechst33342反应液,避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液,每孔每次加入300 μ L PBS洗3次,每次5min,每孔加300 μ L PBS保存,拍照,计数细胞增殖率。

[0013] 优选的,所述Apollo染色反应液配制1.5mL的配方为去离子水(A)1407 μ L、Apollo反应缓冲液(B)75 μ L、Apollo催化剂溶液(C)15 μ L、Apollo荧光染料溶液(D)4.5 μ L、Apollo缓冲添加剂(E)13.5mg。

[0014] 优选的,所述S3中的MTS法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至96孔培养板中,接种量为8 \times 10³个/孔,每组设6个副孔,每孔加入100 μ L培养基,在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育,24h后,每孔分别加入10 μ L、5mg/mL的MTS溶液,在培养箱中继续培养2h,然后取出细胞,使用酶标仪在490nm处测定各孔的吸光值,根据吸光值计算细胞活力:细胞活力(%of control)=(药物组A值-调零孔A值)/(对照孔A值-调零孔A值) \times 100%。

[0015] 优选的,所述S4中的划痕法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至6孔培养板中,接种量为5 \times 10⁵个/孔,每孔加入3ml的培养基,培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育;待细胞生长至对数生长期,进行划痕操作,划痕结束后用PBS洗3次,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 μ mol/L P6肽,200 μ mol/L P9肽,200 μ mol/L P6+P9肽,200 μ mol/L P11肽。0h、12h、24h在100 \times 镜下进行拍照。计算细胞迁移率:细胞迁移率(%)=(划痕0h的距离-划痕24h的距离)/划痕0h的距离 \times 100%

[0016] 优选的,所述S4中的迁移(Transwell法)实验的具体过程为将小室置于24孔板中,小室下层加入600 μ L含20%血清的培养基,上层加入200 μ L不含血清的培养基,每孔4 \times 10⁴个细胞,37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育24h,取出培养板,弃去培养基,每孔加75%酒精固定15min,PBS洗2次,结晶紫染色10min,自来水冲洗,将结晶紫洗去,用棉签将小室上层擦干净,用刀片轻轻刮下薄膜放于载玻片上,用中性树脂固定,100 \times 镜下拍照。

[0017] 优选的,所述S4中的侵袭(Invasion法)实验的具体过程为将小室置于24孔板中,小室下层加入600 μ L含20%血清的培养基,上层加入200 μ L不含血清的培养基,每孔8 \times 10⁴个细胞,37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育24h,取出培养板,弃去培养基,每孔加75%酒精固定15min,PBS洗2次,结晶紫染色10min,自来水冲洗,将结晶紫洗去,用棉签将小室上层擦干净,用刀片轻轻刮下薄膜放于载玻片上,用中性树脂固定,100 \times 镜下拍照。

[0018] 优选的,所述Western blot法的具体过程为分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、

TPC-1、ARO,铺至60mm培养皿中,待细胞生长至对数生长期,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 $\mu\text{mol/L}$ P6肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P6+P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P11肽,培养24h后提取蛋白,采用Western Blot法检测cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达情况。

[0019] 优选的,所述S5中的裸鼠移植瘤实验的具体过程为将细胞消化计数,用PBS重悬细胞配制成 5×10^6 个/mL的细胞悬液,采用1mL注射器取细胞悬液0.2mL注射于裸鼠右侧腋下,接种后24h,分别将接种有人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO的裸鼠按体重随机分为5组,每组6只:阴性对照组:(生理盐水),P6肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P6肽+P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P11肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),各组均采用皮下注射,给药体积按照0.1mL/10g进行,共给药28天,实验期间裸鼠自由进食和饮水,每日测量裸鼠体重及肿瘤的长(a)短(b)径,并按公式:体积= $\pi/6 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。裸鼠处死后,取出肿瘤并称量,按下列公式计算肿瘤生长抑制率,肿瘤生长抑制率(Inhibition rate,IR) = (1-给药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重) $\times 100\%$,绘制裸鼠肿瘤体积变化曲线、肿瘤重量、抑瘤率、裸鼠体重变化曲线。

[0020] 通过蛋白免疫印迹(Western blot)法、MTS法、EDU法检测发现,加入200 $\mu\text{mol/L}$ 的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,抑制细胞生长作用较其他组都强;通过划痕、迁移及侵袭实验检测发现,加入200 $\mu\text{mol/L}$ 的P11肽作用于人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO时,显示出比其他组更强的抑制细胞迁移和侵袭的能力;通过裸鼠移植瘤实验表明,生物活性肽P11肽具有比其它给药组更强的抑制人甲状腺癌细胞生长的作用。

具体实施方式

[0021] 图1为生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞增殖的作用结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,P11肽组;图1中的A-B为EDU法检测生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞增殖的影响;图1中的C为MTS法检测生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞活力的影响);

[0022] 图2为生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞迁移(划痕法)能力作用结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,P11肽组;图2中的A为0h、12h、24h人甲状腺癌细胞迁移结果图;图2中的B为各组人甲状腺癌细胞迁移率统计图);

[0023] 图3为生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞迁移(Transwell法)和侵袭能力作用结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,P11肽组;图3中的A、B为各组人甲状腺癌细胞迁移和侵袭结果图;图3中的C、D为各组人甲状腺癌细胞迁移和侵袭数量统计图);

[0024] 图4为生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞中相关凋亡蛋白表达检测结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,P11肽组;图4中的A为Western blot法检测人甲状腺癌细胞中cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达情况;图4中的B-D为各组人甲状腺癌细胞中cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达统计);

[0025] 图5为生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞中介导凋亡的PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白表达检测结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,

P11肽组;图5中的A为Western blot法检测人甲状腺癌细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR的蛋白表达情况;图5中的B-D为各组人甲状腺癌细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR分析统计);

[0026] 图6为采用裸鼠移植瘤实验检测生物活性肽P11对人甲状腺癌移植瘤生长的作用结果图(其中:control为阴性对照组,P6肽、P9肽、P6+P9肽为阳性对照组,P11肽组;图6中的A为人甲状腺癌移植瘤体积变化趋势图;B为肿瘤的重量;C为抑瘤率;D为裸鼠体重变化趋势图)。

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0028] 实施例1

[0029] 为检测上述肿瘤细胞增殖的影响,发明人做了进一步的检测实验,相关过程介绍如下。

[0030] 1.采用EDU法确定生物活性肽p11对肿瘤细胞增殖的影响,具体过程如下:

[0031] EDU标记(24孔板操作):用细胞培养基按1000:1的比例稀释EDU溶液(试剂A),制备适量50 μ M EDU培养基;每孔加入300 μ L 50 μ M EDU培养基孵育2h,弃培养基;PBS清洗细胞2次,每次5min。

[0032] 细胞固定:每孔加入150 μ L细胞固定液(即含4%多聚甲醛的PBS)室温孵育30min,弃固定液;每孔加入150 μ L 2mg/mL甘氨酸,脱色摇床孵育5min,弃甘氨酸溶液;每孔加入300 μ L PBS,清洗1次,5min,弃PBS;(加强)每孔加入100 μ L渗透剂(0.5%Triton-X100的PBS)脱色摇床孵育10min,PBS清洗1次,5min。

[0033] Apollo染色:每孔加入300 μ L的1 \times Apollo染色反应液(一定要按顺序配,现用现配,30min用完),避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液;

[0034] Apollo染色反应液配制:1.5mL。

去离子水(A) 1407 μ L

Apollo 反应缓冲液(B) 75 μ L

[0035] Apollo 催化剂溶液(C) 15 μ L

Apollo 荧光染料溶液(D) 4.5 μ L

Apollo 缓冲添加剂(E) 13.5 mg

[0036] 加入300 μ L渗透剂(0.5%Triton-X100的PBS)脱色摇床清洗2次,每次10min,弃渗透剂;(加强)每孔每次加入300 μ L甲醇清洗1-2次,每次5min,PBS洗1次,每次5min。

[0037] DNA染色:用去离子水按100:1的比例稀释试剂F,制备适量1 \times Hoechst33342反应液,避光保存;每孔加入300 μ L1 \times Hoechst33342反应液,避光,室温,脱色摇床孵育30min,弃染色反应液;每孔每次加入300 μ L PBS洗3次,每次5min;每孔加300 μ L PBS保存,拍照,计数细胞增殖率。

[0038] 结果如图1中的A-B所示。从图中可以看出,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处

理组相比,生物活性肽P11能够显著降低人甲状腺癌细胞的增殖率。

[0039] 2.采用MTS法确定生物活性肽P11对肿瘤细胞活性的影响,具体过程如下:

[0040] 分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至96孔培养板中,接种量为 8×10^3 个/孔,每组设6个副孔,每孔加入100 μ L培养基,在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育;

[0041] 24h后,每孔分别加入10 μ L、5mg/mL的MTS溶液,在培养箱中继续培养2h;

[0042] 然后取出细胞,使用酶标仪在490nm处测定各孔的吸光值,根据吸光值计算细胞活力:

[0043] 细胞活力(% of control) = (药物组A值-调零孔A值) / (对照孔A值-调零孔A值) \times 100%

[0044] 实验结果如图1中的C所示,从图C可以看出,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,生物活性肽P11能够显著降低人甲状腺癌细胞的活性。

[0045] 实施例2

[0046] 为检测生物活性肽P11对肿瘤细胞迁移、侵袭的影响,发明人做了划痕、迁移、侵袭检测实验,相关过程介绍如下。

[0047] 1.采用划痕法确定生物活性肽P11对肿瘤细胞迁移的影响,具体过程如下:

[0048] 分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至6孔培养板中,接种量为 5×10^5 个/孔,每孔加入3ml的培养基,培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育;待细胞生长至对数生长期,进行划痕操作,划痕结束后用PBS洗3次,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 μ mol/L P6肽,200 μ mol/L P9肽,200 μ mol/L P6+P9肽,200 μ mol/L P11肽。0h、12h,24h在100 \times 镜下进行拍照。计算细胞迁移率:

[0049] 细胞迁移率(%) = (划痕0h的距离-划痕24h的距离) / 划痕0h的距离 \times 100%

[0050] 2.采用Transwell法确定生物活性肽p11对肿瘤细胞迁移的影响,具体过程如下:

[0051] 将小室置于24孔板中,小室下层加入600 μ L含20%血清的培养基,上层加入200 μ L不含血清的培养基,每孔 4×10^4 个细胞,37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育24h;

[0052] 取出培养板,弃去培养基,每孔加75%酒精固定15min,PBS洗2次;

[0053] 结晶紫染色10min,自来水冲洗,将结晶紫洗去,用棉签将小室上层擦干净,用刀片轻轻刮下薄膜放于载玻片上,用中性树胶固定,100 \times 镜下拍照。3.采用Invasion法确定生物活性肽p11对肿瘤细胞侵袭的影响,具体过程如下:

[0054] 具体操作同2,不同的是小室上有基质胶,每孔 8×10^4 个细胞。

[0055] 划痕结果如图2所示,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,生物活性肽P11能够显著降低人甲状腺癌细胞的迁移能力。

[0056] Transwell和Invasion结果如图3所示,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,生物活性肽P11能够显著降低人甲状腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

[0057] 实施例3

[0058] 为检测生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞凋亡的影响,发明人进行了凋亡相关蛋白表达的检测,相关过程介绍如下。

[0059] Western blot法检测人甲状腺癌细胞中凋亡相关蛋白的表达水平,具体过程如下:

[0060] 分别消化计数人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO,铺至60mm培养皿中,待细胞生长至

对数生长期,各组更换无血清培养基,其中对照组加入PBS,给药组分别加入200 $\mu\text{mol/L}$ P6肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P6+P9肽,200 $\mu\text{mol/L}$ P11肽。培养24h后提取蛋白,采用Western Blot法检测cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达情况。

[0061] 结果如图4所示,在人甲状腺癌细胞TT、TPC-1和ARO中,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,P11肽组中cleaved caspase-3、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved PARP的蛋白表达量明显升高,表明生物活性肽P11可以诱导人甲状腺癌细胞凋亡。

[0062] 实施例4

[0063] 为检测生物活性肽P11对人甲状腺癌细胞中介导凋亡的PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响,发明人进行了PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的检测,相关过程介绍如下。

[0064] Western blot法检测人甲状腺癌细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的表达水平,具体过程如下:

[0065] 具体操作同实施例3,不同的是提取蛋白后采用Western Blot实验检测PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、m-TOR、p-mTOR的蛋白表达情况。

[0066] 结果如图5所示,在人甲状腺癌细胞TT、TPC-1和ARO中,与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,P11肽组中p-PI3K、p-AKT以及p-mTOR的蛋白表达量明显降低,表明P11肽在人甲状腺癌细胞TT、TPC-1和ARO中可以通过阻断PI3K/AKT/mTOR信号通路从而促进肿瘤细胞凋亡。

[0067] 实施例5

[0068] 为了验证生物活性肽P11在动物水平能够抑制人甲状腺癌的生长,发明人进行了裸鼠移植瘤实验,相关过程介绍如下。

[0069] 采用裸鼠移植瘤实验确定生物活性肽p11抑制人甲状腺癌的生长,具体过程如下:

[0070] 将细胞消化计数,用PBS重悬细胞配制成 5×10^6 个/mL的细胞悬液,采用1mL注射器取细胞悬液0.2mL注射于裸鼠右侧腋下;接种后24h,分别将接种有人甲状腺癌细胞TT、TPC-1、ARO的裸鼠按体重随机分为5组,每组6只:阴性对照组:(生理盐水),P6肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P6肽+P9肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),P11肽组(320 $\mu\text{g/kg/d}$),各组均采用皮下注射,给药体积按照0.1mL/10g进行,共给药28天,实验期间裸鼠自由进食和饮水。每日测量裸鼠体重及肿瘤的长(a)短(b)径,并按公式:体积= $\pi/6 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。裸鼠处死后,取出肿瘤并称重,按下列公式计算肿瘤生长抑制率,肿瘤生长抑制率(Inhibition rate,IR) = (1-给药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重) \times 100%。裸鼠肿瘤体积变化曲线、肿瘤重量、抑瘤率、裸鼠体重变化曲线见图6。

[0071] 结果如图6所示,图6中的A为肿瘤体积变化曲线,结果表明与阴性对照组和P6肽、P9肽、P6+P9肽处理组相比,生物活性肽P11能够明显减缓人甲状腺癌生长;图6中的B为各组瘤重,可见P11肽组肿瘤重量明显减轻;图6中的C是根据瘤重统计得出的抑瘤率,可见P11肽组的抑瘤率最高;图6中的D为裸鼠体重变化曲线,结果表明各组裸鼠体重无明显变化。

[0072] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其

发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

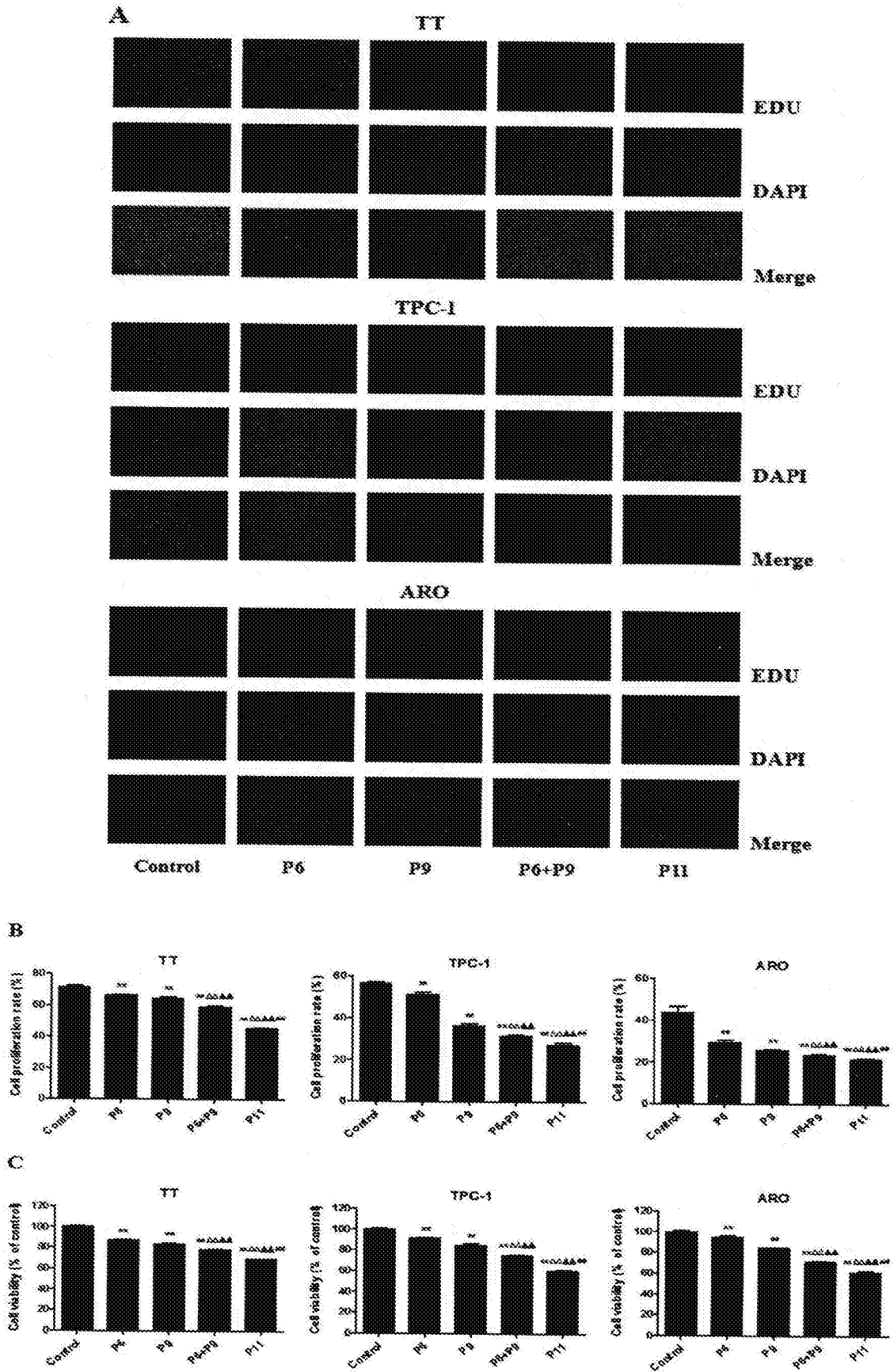


图1

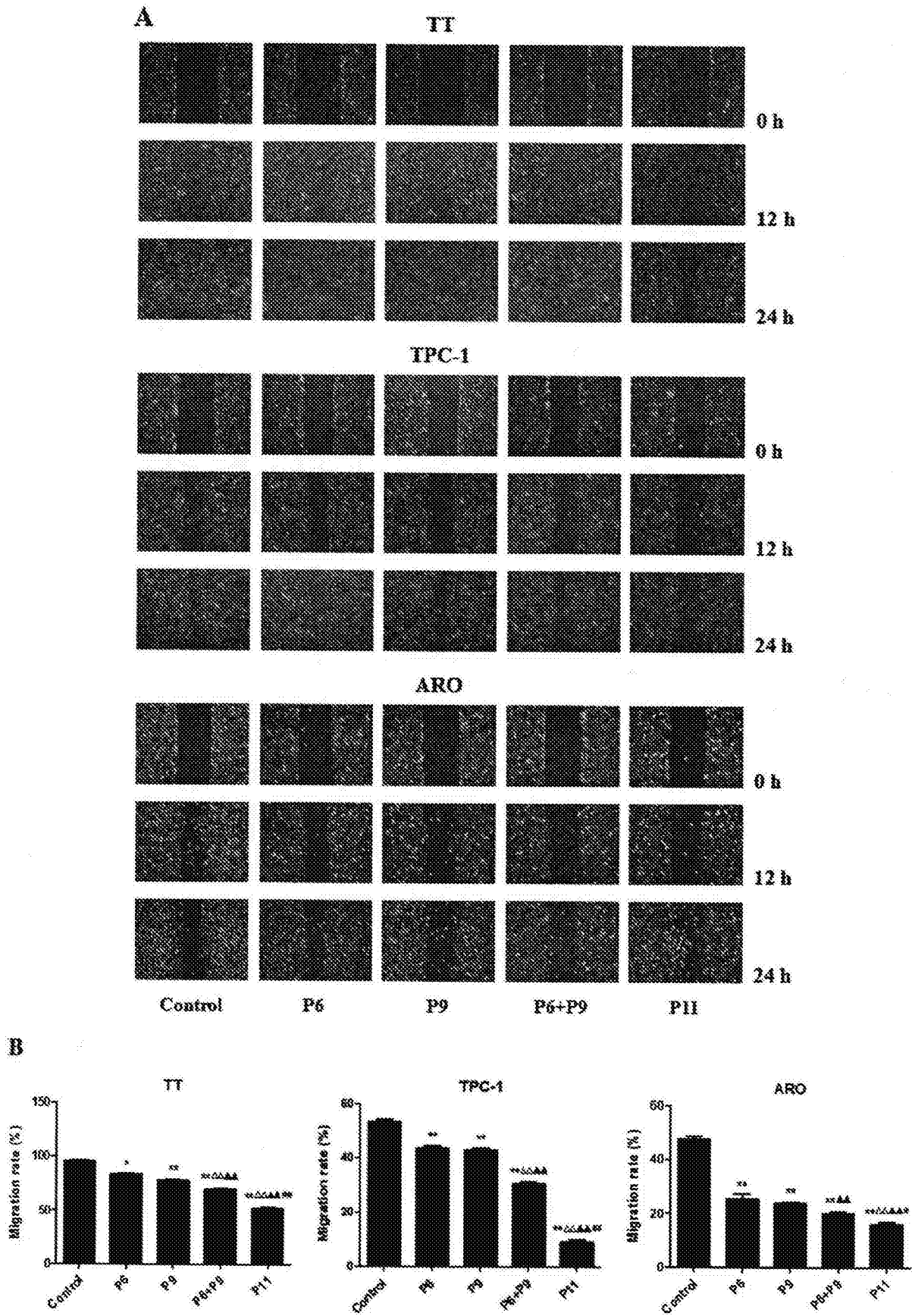


图2

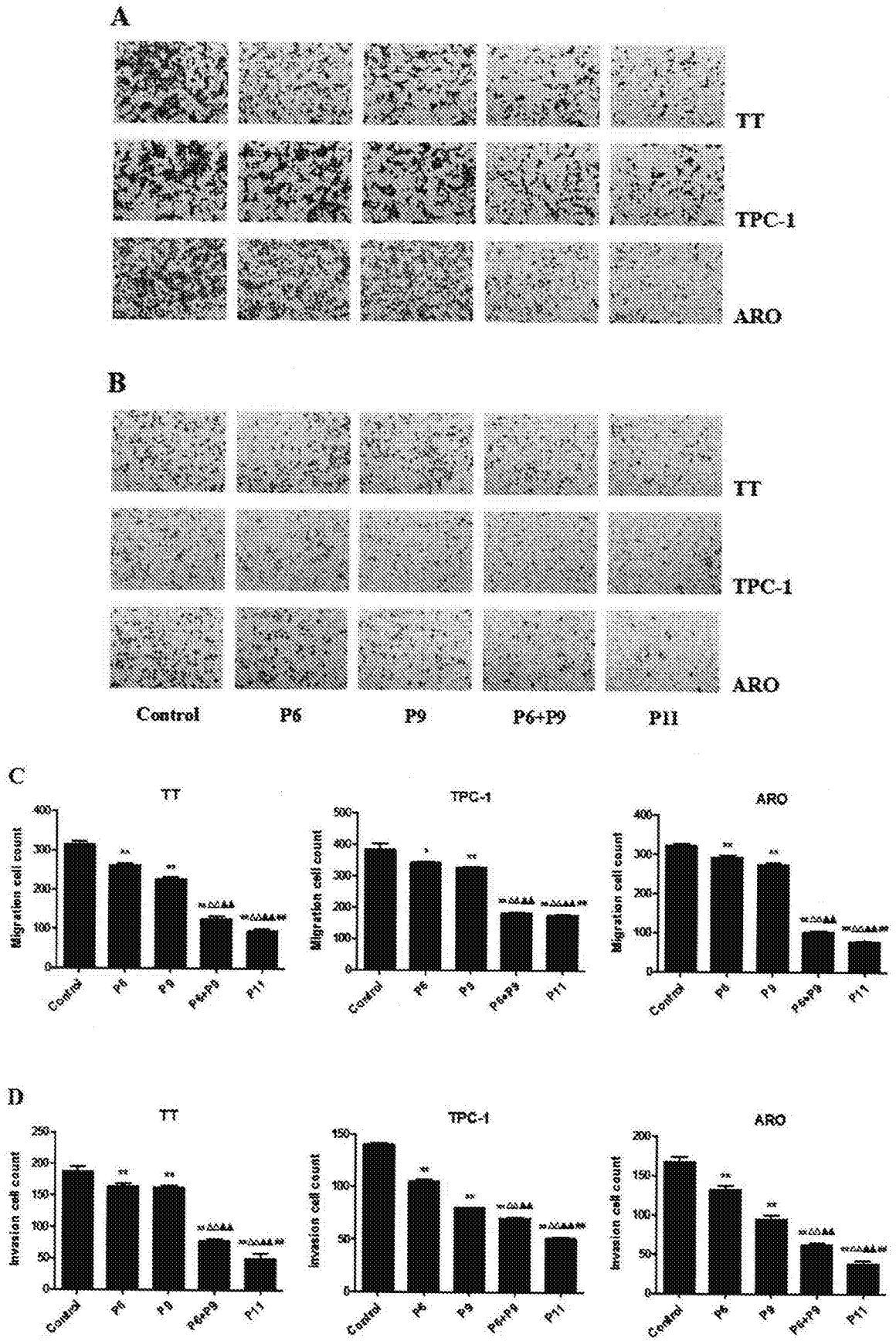


图3

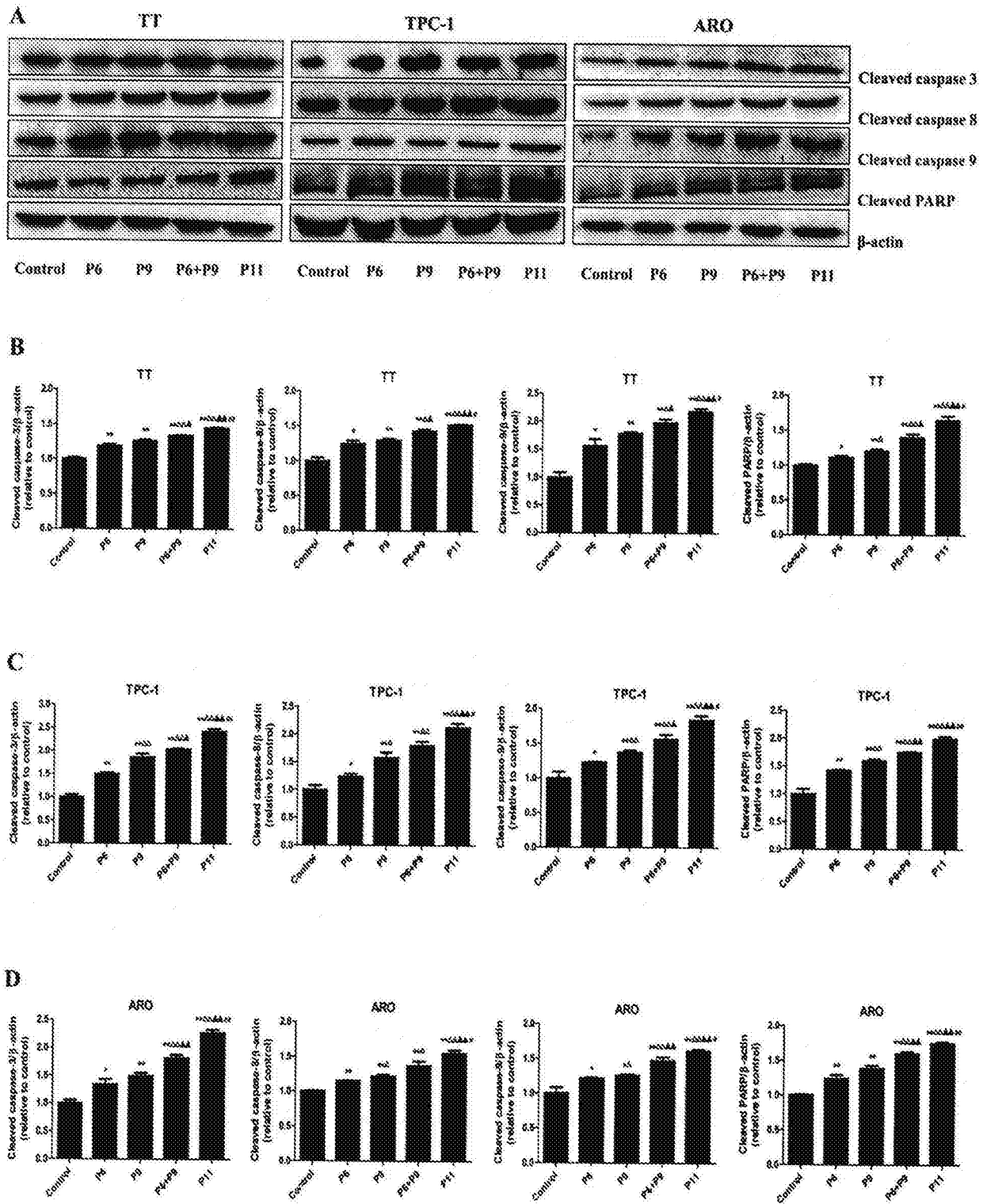


图4

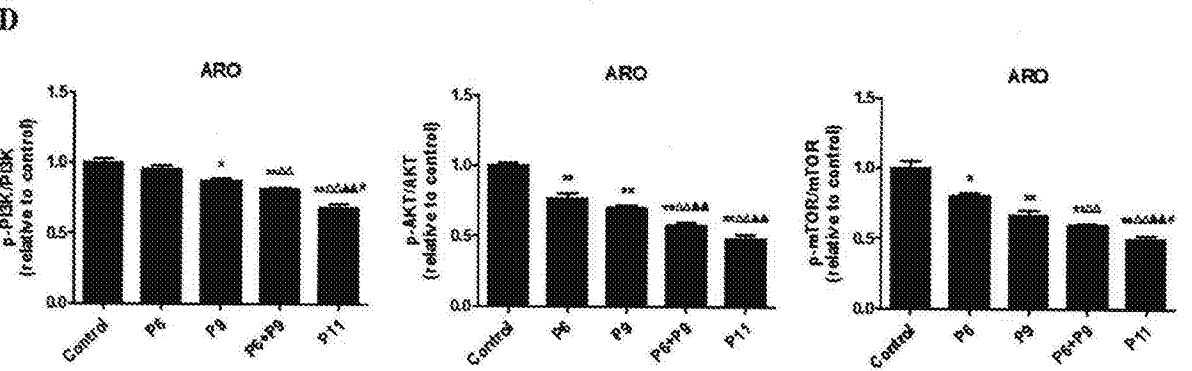
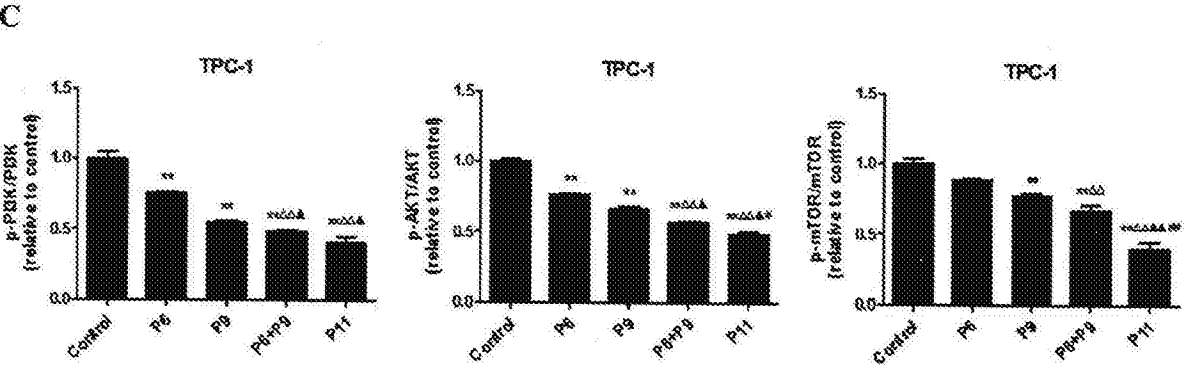
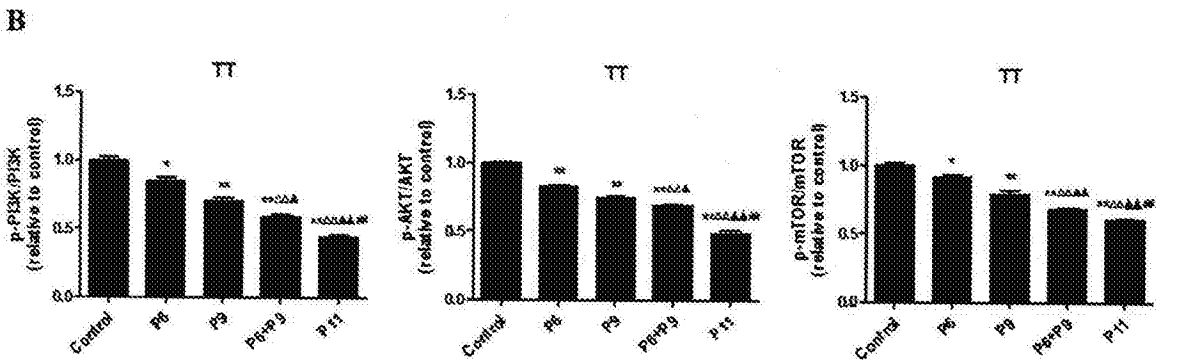
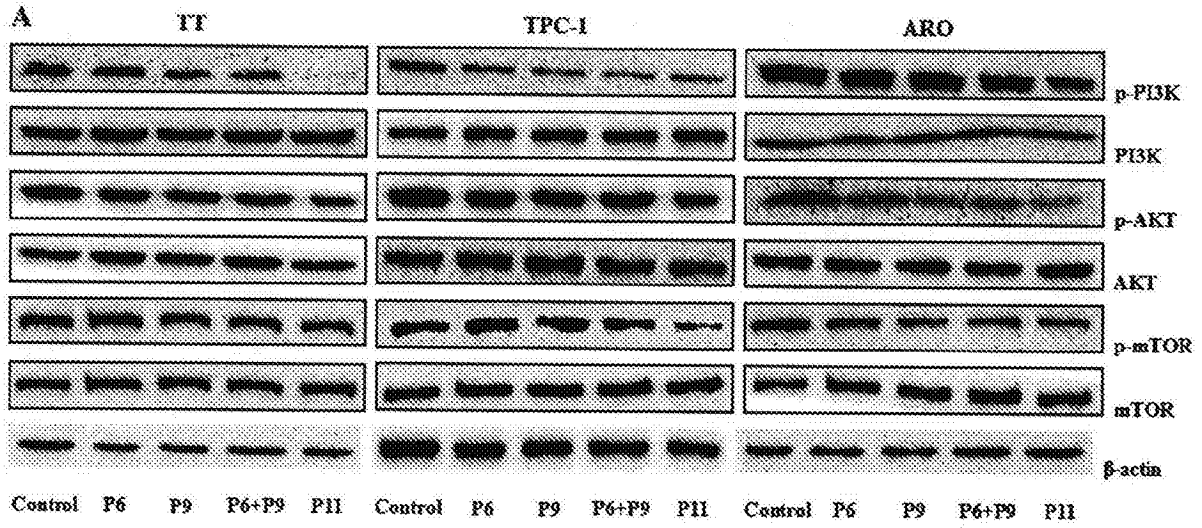
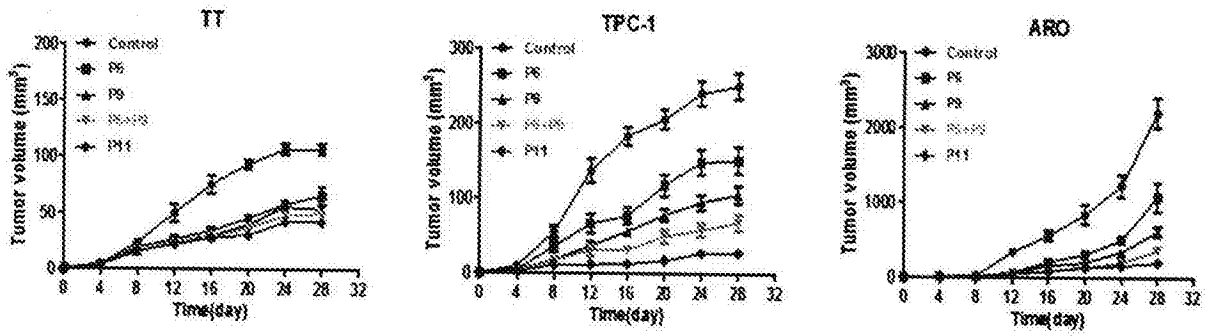
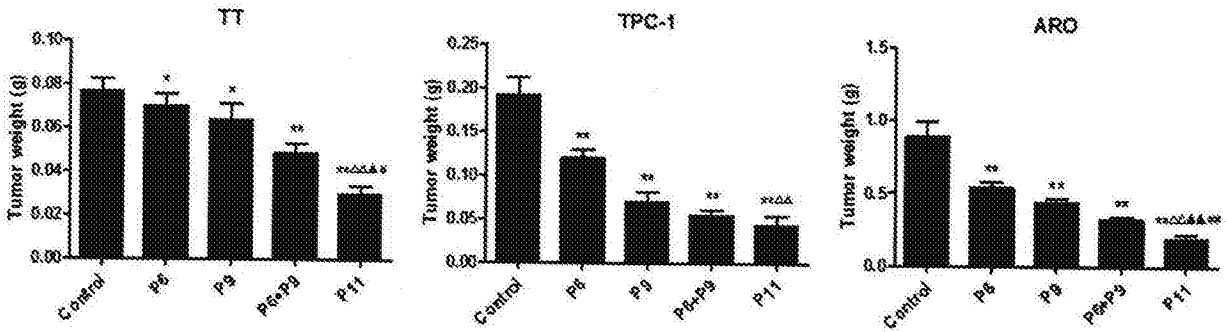


图5

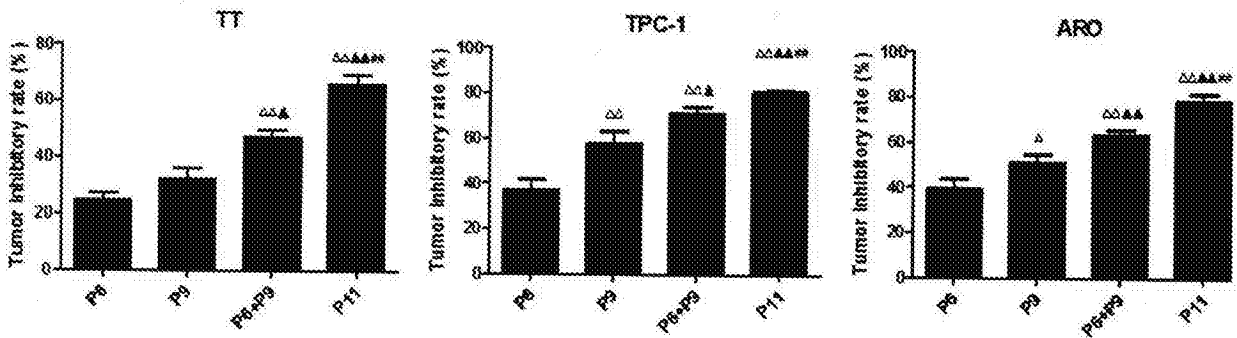
A



B



C



D

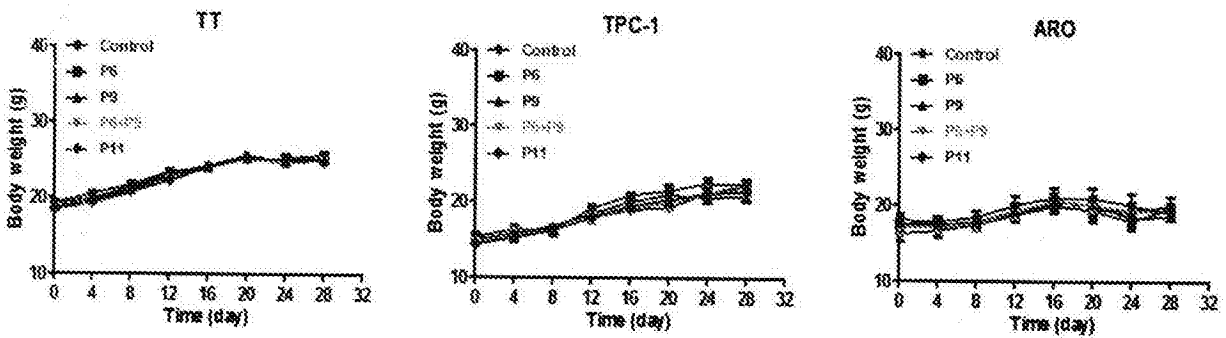


图6