



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103743909 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201310653721. 8

(22) 申请日 2013. 11. 29

(73) 专利权人 漯河医学高等专科学校

地址 462002 河南省漯河市大学路 148 号漯河医学高等专科学校医疗系

(72) 发明人 徐松涛 马永超 刘晓东 范文娟 郭小慧 吴华 李飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101120959 A, 2008. 02. 13, 全文.

CN 101346397 A, 2009. 01. 14, 全文.

JP 2010-229122 A, 2010. 10. 14, 全文.

WO 2007/046781 A1, 2007. 04. 26, 全文.

Julia M. Coppola, et al.. A

Small-Molecule Furin Inhibitor Inhibits Cancer Motility and Invasiveness..

《Neoplasia》. 2008, 第 10 卷 (第 4 期), 第 363-370 页.

YongChao Ma, et al.. Effect of Furin inhibitor on lung adenocarcinoma cell growth and metastasis.. 《Cancer Cell International》. 2014, 第 14 卷 (第 43 期), 第 1-6 页.

侯俊娜, 等. siRNA 沉默 MIF 基因抑制大细胞肺癌 H460 细胞增殖. 《中国病理生理杂志》. 2011, 第 27 卷 (第 5 期), 第 853-858 页.

审查员 张绚

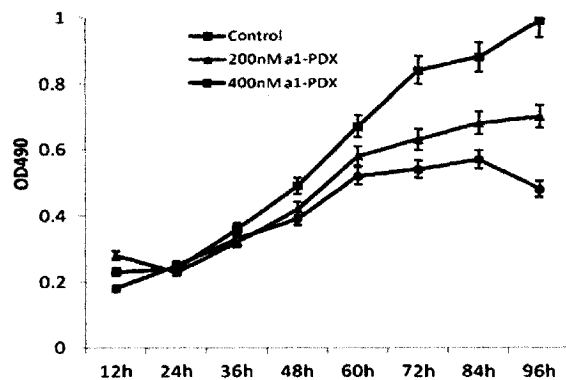
权利要求书1页 说明书5页 附图7页

(54) 发明名称

弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法

(57) 摘要

本发明涉及一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,具体包括以下步骤:(1)MTT 法检测细胞的增殖;(2)A549 细胞克隆形成能力检测;(3)Hochest33342 / PI 双染法检测细胞凋亡;(4)单层细胞迁移实验 (wound healing);(5)Transwell 侵袭实验;(6)Western blot 检测细胞迁移相关蛋白表达水平;(7)酶联免疫吸附试验;(8)统计分析。本发明通过研究弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌 A549 细胞生长和转移的影响,可以更好地利用 Furin 抑制剂 a1-PDX 抑制 Furin 在肺腺癌 A549 细胞中表达,从而有效地为癌症治疗提供依据。



1. 一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

(1) MTT 法检测细胞的增殖:对数生长期 A549 细胞接种到 96 孔板中,每孔 5×10^3 , 24h 后开始加入 200nM 或 400nM 不同浓度的 a1-PDX 继续培养 24h-96h;每孔加入 $20 \mu\text{l}$ 5 毫克/毫升 MTT 试剂溶液,并于 37°C 温育 4 小时;每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 的 DMSO 溶解甲贖晶体,震荡溶解后检测 490nm 处的光密度;

(2) A549 细胞克隆形成能力检测:取对数生长期的单层培养细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化吹打成单个细胞,把细胞悬浮在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中,以 $1 \times 10^3/\text{ml}$ 的细胞密度接种于培养皿中;加入 200nM 或 400nM 不同浓度的 a1-PDX 置 37°C 、5% CO_2 的饱和湿度环境下,静置培养 2 周;弃去上清液, PBS 小心浸洗 2 次;甲醇固定 15min;去除固定液,吉姆萨染液染色 10min,流水缓慢冲洗后空气干燥后,肉眼直接计数克隆并统计分析;

(3) Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞凋亡:对数生长期细胞 A549 按 1×10^4 个/ml 浓度接种于提前用多聚赖氨酸处理的盖片上;不同浓度的 a1-PDX 处理 48h 后,倾去培养液,加入预冷 PBS 洗涤细胞 2 次;调整 Hoechst 33342/PI 染液浓度至终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 避光染色 15min;弃去染液,加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定 5min;在荧光显微镜下观察拍摄;

(4) 单层细胞迁移实验:A549 细胞接种在 6 孔板,待生长至汇合度达 100% 时,用无菌的 $200 \mu\text{l}$ 的 Tip 头尖制成划痕,并用 PBS 洗涤细胞碎片;在指定的时间用倒置显微镜配备的数码相机拍摄受伤区域的细胞迁移情况;

(5) Transwell 侵袭实验:不同浓度的 a1-PDX 处理的 A549 细胞接种于 Transwell 小室的上部腔室,上部腔室含有 $200 \mu\text{l}$ 的 RPMI1640 培养基,但不含 10% FBS;Transwell 小室下部腔室被填充有 $500 \mu\text{l}$ 的完整的 RPMI1640 培养基,含 10% FBS;使细胞迁移 48 小时,然后用 4% 甲醛将细胞固定,室温下孵育 15 分钟;去离子水洗涤后,0.1% 结晶紫染色;在光学显微镜下拍摄迁移的克隆;

(6) Western blot 检测细胞迁移相关蛋白表达水平:收集细胞加入 RIPA 缓冲液及蛋白酶抑制剂,该 RIPA 缓冲液为 50mM 的 Tris pH 7.4、150mM 氯化钠、1% 的 Triton X-100、0.1% SDS、1% 脱氧胆酸钠和 5mM EDTA, 100mM 的氟化钠混合物,冰上孵育 30 分钟,13200rpm 离心 30min;收集上清并 BCA 法测定蛋白浓度;细胞总蛋白经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到 PVDF 膜,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1h;在 4°C 下孵育 MT1-MMP、VEGF-C、VEGF-D 和 GAPDH 的抗体过夜;PBST 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗,室温下孵育 1h, PBST 洗涤后,超敏发光液孵育后采用 LAS3000 成像仪拍照;

(7) 酶联免疫吸附试验:收集细胞培养上清并根据 MMP-9、MMP-2、VEGF-c ELISA 检测试剂盒说明书进行后续的检测;每个样品重复 5 次;

(8) 统计分析:应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料采用配对 t 检验及单因素方差分析,计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 肺癌是当今世界上严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤,且发病率也正逐年上升,肺癌发病率和死亡率在许多国家均居恶性肿瘤之首。据估计,一年中死于肺癌的患者人数超过前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌总人数。大约85%肺癌患者为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其按病理组织学分为腺癌、鳞癌、大细胞癌等。大多数患者在诊断时已局部进展或远处转移。转移和复发是肺癌患者死亡的主要原因,大约90%的肺癌患者死于肿瘤转移。因而进行深入研肺腺癌浸润、转移的分子机制很有必要。

[0003] Furin 是蛋白前体加工酶家族中的重要成员,许多重要的生理过程需要 Furin 的参与,如多肽与蛋白质激素的合成与分泌、膜受体的成熟、血浆蛋白前体的激活等;同时多种疾病的发生也与 Furin 密切相关,如病毒外壳蛋白和细菌外毒素的加工活化以及肿瘤的转移等。这些蛋白质在发挥活性之前需要经过蛋白转化酶对蛋白前体切割,然后才能成为有功能的蛋白质。包括 Notch、Wnt、MT1-MMP、VEGF 等在内的许多与肿瘤发生发展密切相关的蛋白质在体内成熟过程中,必须经过 Furin 等蛋白转化酶对其前体进行剪切,才能发挥生物学活性。而这些蛋白质中部分成员与肿瘤的发生、发展密切相关,Furin 在多种肿瘤中高表达,可以作为肿瘤进展过程中的 Marker,在某种程度上可以作为肿瘤预后的指标。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,以便更好地利用 Furin 抑制剂 a1-PDX 抑制 Furin 在肺腺癌 A549 细胞中表达,从而有效地为癌症治疗提供依据。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下。

[0006] 一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,具体包括以下步骤:

[0007] (1) MTT 法检测细胞的增殖:

[0008] 对数生长期 A549 细胞接种到 96 孔板中,每孔 5×10^3 ,24h 后开始加入 200nM 或 400nM 不同浓度的 a1-PDX 继续培养 24h-96h;每孔加入 20 μ l 5 毫克/毫升 MTT 试剂溶液,并于 37°C 温育 4 小时。每孔加入 150 μ l 的 DMSO 溶解甲臞晶体,震荡溶解后检测 490nm 处的光密度。

[0009] (2) A549 细胞克隆形成能力检测:

[0010] 取对数生长期的单层培养细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化吹打成单个细胞,把细胞悬浮在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中,以 1×10^3 /ml 的细胞密度接种于培养皿中;加入

不同浓度的 a1-PDX (200nM、400nM) 置 37°C、5% CO₂ 的饱和湿度环境下,静置培养 2 周。弃去上清液, PBS 小心浸洗 2 次; 甲醇固定 15min。去除固定液, 吉姆萨染液染色 10min, 流水缓慢冲洗后空气干燥后, 肉眼直接计数克隆并统计分析。

[0011] (3) Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞凋亡:

[0012] 对数生长期细胞 A549 按 1×10^4 个 /ml 浓度接种于提前用多聚赖氨酸处理的盖片上。不同浓度的 a1-PDX 处理 48h 后, 倾去培养液, 加入预冷 PBS 洗涤细胞 2 次; 调整 Hoechst33342/PI 染液浓度至终浓度 $5 \mu\text{g/ml}$, 37°C 避光染色 15min; 弃去染液, 加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定 5min。在荧光显微镜下观察拍摄。

[0013] (4) 单层细胞迁移实验 (wound healing):

[0014] A549 细胞接种在 6 孔板, 待生长至汇合度达 100% 时, 用无菌的 $200 \mu\text{l}$ 的 Tip 头尖制成划痕 (wound), 并用 PBS 洗涤细胞碎片。细胞处理同前。在指定的时间用倒置显微镜配备的数码相机拍摄受伤区域的细胞迁移情况。

[0015] (5) Transwell 侵袭实验:

[0016] 不同浓度 a1-PDX 处理的 A549 细胞 (1×10^5) 接种于 Transwell 小室的上部腔室, 含有 $200 \mu\text{l}$ 的 RPMI1640 培养基, 但不含 10% FBS。Transwell 小室下部腔室被填充有 $500 \mu\text{l}$ 的完整的 RPMI1640 培养基, 含 10% FBS。使细胞迁移 48 小时, 然后用 4% 甲醛将细胞固定, 室温下孵育 15 分钟。去离子水洗涤后, 0.1% 结晶紫染色。在光学显微镜下拍摄迁移的克隆。

[0017] (6) Western blot 检测细胞迁移相关蛋白表达水平:

[0018] 收集细胞加入 RIPA 缓冲液 (50mM 的 Tris pH 7.4, 150mM 氯化钠, 1% 的 Triton X-100, 0.1% SDS, 1% 脱氧胆酸钠, 5mM EDTA, 100mM 的氟化钠) 及蛋白酶抑制剂, 冰上孵育 30 分钟, 13200rpm 离心 30min。收集上清并 BCA 法 (Pierce, USA) 测定蛋白浓度。细胞总蛋白经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到 PVDF 膜, 室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1h。在 4°C 下孵育 MT1-MMP、VEGF-C、VEGF-D 和 GAPDH (1 : 1000) 的抗体过夜。PBST 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 室温下孵育 1h, PBST 洗涤后, 超敏发光液 (Pierce 公司, 美国) 孵育后, LAS3000 成像仪 (富士, 日本) 拍照。

[0019] (7) 酶联免疫吸附试验:

[0020] A549 细胞处理同前所述, 收集细胞培养上清并根据 MMP-9、MMP-2、VEGF-c ELISA 检测试剂盒说明书进行后续的检测。每个样品重复 5 次。

[0021] (8) 统计分析:

[0022] 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料采用配对 t 检验及单因素方差分析, 计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

[0023] 该发明的有益效果在于: 本发明通过研究弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌 A549 细胞生长和转移的影响, 可以更好地利用 Furin 抑制剂 a1-PDX 抑制 Furin 在肺腺癌 A549 细胞中表达, 从而有效地为癌症治疗提供依据。

附图说明

[0024] 图 1 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞的增殖影响图。

[0025] 图 2 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞的集落形成影响图。

- [0026] 图 3 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞凋亡的影响图 (对照组)。
- [0027] 图 4 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞凋亡的影响图 (200nM a1-PDX 处理组)。
- [0028] 图 5 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞凋亡的影响图 (400nM a1-PDX 处理组)。
- [0029] 图 6 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞凋亡的影响图 (三次独立实验细胞凋亡率统计分析)。
- [0030] 图 7 是本发明实施例中单层细胞划痕检测 a1-PDX 对细胞迁移的影响图。
- [0031] 图 8 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞迁移的影响的三次独立实验统计分析图。
- [0032] 图 9 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 浸润能力的影响图 (对照组)。
- [0033] 图 10 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 浸润能力的影响图 (200nM a1-PDX 处理组)。
- [0034] 图 11 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 浸润能力的影响图 (400nM a1-PDX 处理组)。
- [0035] 图 12 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 三次独立实验细胞浸润能力统计分析图。
- [0036] 图 13 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞迁移相关蛋白表达的影响图。
- [0037] 图 14 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞 MMP-9 表达的影响图。
- [0038] 图 15 是本发明实施例中 a1-PDX 对 A549 细胞 MMP-2 表达的影响图。

具体实施方式

[0039] 下面结合附图对本发明的具体实施方式进行描述,以便更好的理解本发明。

[0040] 实施例

[0041] 一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法,具体包括如下方面:

[0042] (1) 细胞培养过程:人肺腺癌细胞系 A549 购自中国医学科学院协和细胞库。生长在含有 10%胎牛血清 (FBS) 和 100 单位 /mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基 (Gibco, USA) 中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度下培养。

[0043] (2) 所用主要试剂包括:Furin 抑制剂 a1-PDX (Merck 货号:126850-2.5MG) 溶于 DMSO 中,制成 5mM 母液。鼠抗人 VEGF-C, VEGF-D, MT1-MMP 和 GAPDH 抗体均购自 Santa Cruz 公司 (Santa Cruz, 美国)。抗鼠 IgG 抗体-HRP 和抗兔 IgG-HRP,购自西格玛公司 (Sigma, USA);MTT、Hochest33342、Transwell 购自美国 Promega 公司;MMP2、MMP9ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物试剂公司。其它试剂均为国产分析纯。

[0044] (3) 具体实施过程及方法实验方法:

[0045] (3a) MTT 法检测细胞的增殖:

[0046] 对数生长期 A549 细胞接种到 96 孔板中 (每孔 5×10^3), 24h 后开始加入不同浓度的 a1-PDX (200nM、400nM) 继续培养 24h-96h。每孔加入 20 μ l MTT 试剂 (5 毫克 / 毫升) 溶液,并于 37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。每孔加入 150 μ l 的 DMSO 溶解甲臞晶体,震荡溶解后检测 490nm 处的光密度。

[0047] (3b) A549 细胞克隆形成能力检测：

[0048] 取对数生长期的单层培养细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化吹打成单个细胞，把细胞悬浮在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中，以 1×10^3 /ml 的细胞密度接种于培养皿中。加入不同浓度的 a1-PDX (200nM、400nM) 置 37°C、5% CO₂ 的饱和湿度环境下，静置培养 2 周。弃去上清液，PBS 小心浸洗 2 次。甲醇固定 15min。去除固定液，吉姆萨染液染色 10min，流水缓慢冲洗后空气干燥后，肉眼直接计数克隆并统计分析。

[0049] (3c) Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞凋亡：

[0050] 对数生长期细胞 A549 按 1×10^4 个/ml 浓度接种于提前用多聚赖氨酸处理的盖片上。不同浓度的 a1-PDX 处理 48h 后，倾去培养液，加入预冷 PBS 洗涤细胞 2 次；调整 Hoechst 33342/PI 染液浓度至终浓度 5 μ g/ml，37°C 避光染色 15min；弃去染液，加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定 5min。在荧光显微镜下观察拍摄。

[0051] (3d) 单层细胞迁移实验 (wound healing)：

[0052] A549 细胞接种在 6 孔板，待生长至汇合度达 100% 时，用无菌的 200 μ l 的 Tip 头尖制成划痕 (wound)，并用 PBS 洗涤细胞碎片。细胞处理同前。在指定的时间用倒置显微镜配备的数码相机拍摄受伤区域的细胞迁移情况。

[0053] (3e) Transwell 侵袭实验：

[0054] 不同浓度 a1-PDX 处理的 A549 细胞 (1×10^5) 接种于 Transwell 小室的上部腔室，含有 200 μ l 的 RPMI1640 培养基，但不含 10% FBS。Transwell 小室下部腔室被填充有 500 μ l 的完整的 RPMI1640 培养基，含 10% FBS。使细胞迁移 48 小时，然后用 4% 甲醛将细胞固定，室温下孵育 15 分钟。去离子水洗涤后，0.1% 结晶紫染色。在光学显微镜下拍摄迁移的克隆。

[0055] (3f) Western blot 检测细胞迁移相关蛋白表达水平：

[0056] A549 细胞培养及处理同前。收集细胞加入 RIPA 缓冲液 (50mM 的 Tris pH 7.4, 150mM 氯化钠, 1% 的 Triton X-100, 0.1% SDS, 1% 脱氧胆酸钠, 5mM EDTA, 100mM 的氟化钠) 及蛋白酶抑制剂，冰上孵育 30 分钟，13200rpm 离心 30min。收集上清并 BCA 法 (Pierce, USA) 测定蛋白浓度。细胞总蛋白经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到 PVDF 膜，室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1h。在 4°C 下孵育 MT1-MMP、VEGF-C、VEGF-D 和 GAPDH (1 : 1000) 的抗体过夜。PBST 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗，室温下孵育 1h，PBST 洗涤后，超敏发光液 (Pierce 公司，美国) 孵育后，LAS3000 成像仪 (富士，日本) 拍照。

[0057] (3g) 酶联免疫吸附试验：

[0058] A549 细胞处理同前所述，收集细胞培养上清并根据 MMP-9、MMP-2、VEGF-c ELISA 检测试剂盒说明书进行后续的检测。每个样品重复 5 次。

[0059] (4) 统计分析：

[0060] 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理，计量资料采用配对 t 检验及单因素方差分析，计数资料采用卡方检验， $P < 0.05$ 具有统计学意义。

[0061] (5) 实施结果：

[0062] (5a) a1-PDX 对 A549 细胞的增殖和集落形成的影响：

[0063] 不同浓度的 a1-PDX 作用 A549 不同时间后，MTT 法检测细胞的存活，如图 1 所示。结果显示，a1-PDX 作用 A549 细胞 48h 以上时，细胞的生长受到显著抑制。集落形成法检测

A549 细胞的克隆形成。结果表明,与对照组相比,a1-PDX 处理的 A549 细胞的集落形成能力显著降低,如图 2 所示。

[0064] (5b) a1-PDX 对 A549 细胞凋亡的影响:

[0065] 为探讨 a1-PDX 对 A549 细胞生长抑制的机制,首先使用 Hoechst33342/PI 双染检测 A549 细胞凋亡。结果表明,a1-PDX 能诱导 A549 细胞凋亡的发生,如图 3、图 4、图 5、图 6 所示。

[0066] (5c) a1-PDX 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响:

[0067] 为检测 a1-PDX 是否对 A549 细胞的迁移和侵袭有调节作用,用 wound Healing 和 Transwell 实验进一步检测了 A549 细胞迁移的情况。两种实验结果均表明 a1-PDX 显著降低了 A549 细胞迁移和侵袭能力,如图 7、图 8、图 9、图 10、图 11、图 12 所示。

[0068] (5d) a1-PDX 对细胞迁移相关蛋白的表达的影响:

[0069] 许多蛋白质在体内参与肿瘤细胞迁移的调节。为充分了解 a1-PDX 调节 A549 细胞迁移的分子机制,通过 Western Blot 和 ELISA 法检测了细胞 MT1-MMP、MMP2、MMP9、VEGF-c、VEGF-d 蛋白表达水平。如图 13 所示,a1-PDX 显著降低了细胞内 MT1-MMP、VEGF-c、VEGF-d 的表达。同时细胞培养液上清中 MMP2 和 MMP9 浓度也明显低于对照组,如图 14、图 15 所示。这些结果表明,a1-PDX 抑制 A549 细胞迁移可能与降低 MT1-MMP, MMP2/9, VEGF-C/D 的表达有关。

[0070] 在本发明实施例中,Furin 抑制剂 a1-PDX 可诱导 A549 细胞增殖抑制和凋亡。此外,A549 细胞经 a1-PDX 孵育后,迁移能力显著降低。这些基质金属蛋白酶的表达水平,有效地反映肿瘤细胞的浸润能力。a1-PDX 不仅能抑制 MMP2 和 MMP9 的表达,而且能降低 MT1-MMP 的表达。a1-PDX 降低了 Furin 酶活性,进而降低了 MT1-MMP 成熟及激活,进一步抑制了 MMP2、MMP9 的成熟。a1-PDX 处理的细胞 VEGF-C 和 VEGF-D 蛋白表达显著减少。下调 Furin 酶活性,从而抑制 A549 细胞的 MMPs 和 VEGFs 蛋白的表达可能是其抑制 A549 生长和迁移、浸润的机制。

[0071] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

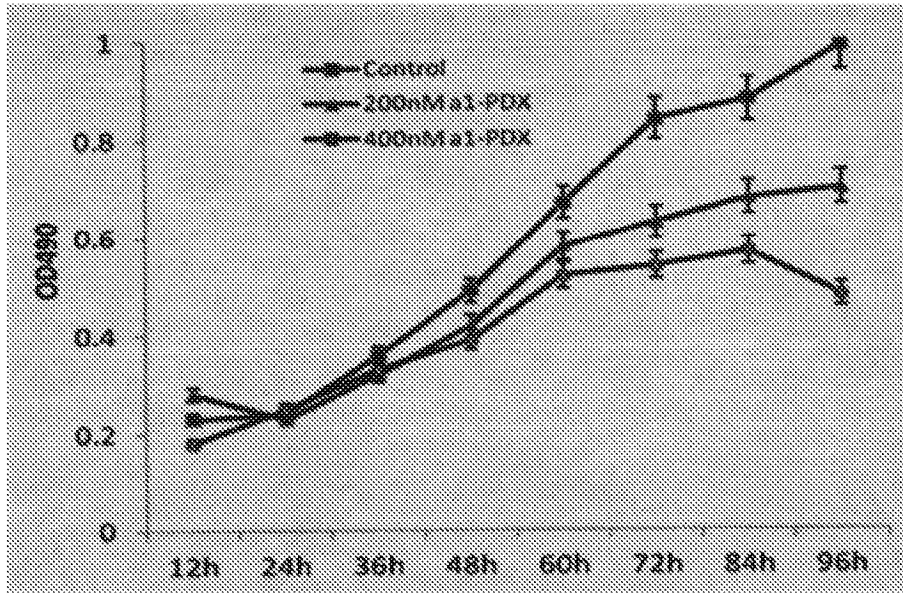


图 1

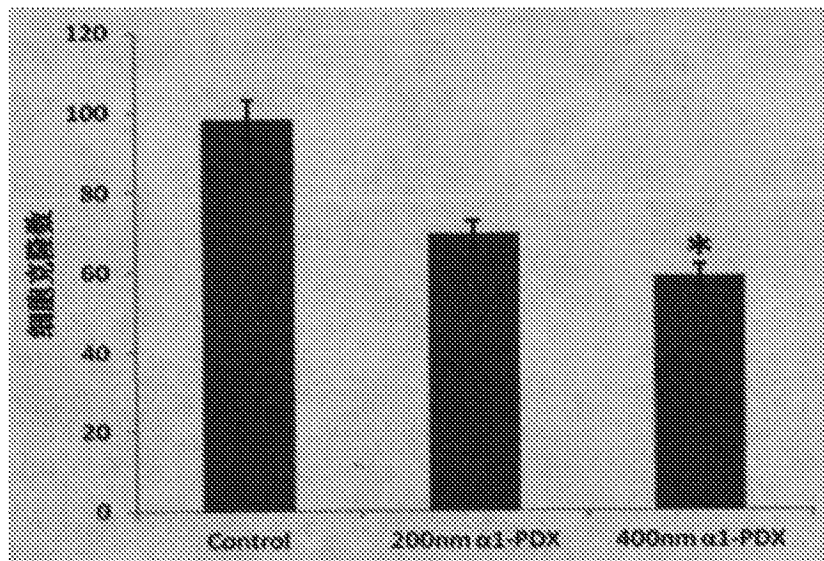


图 2

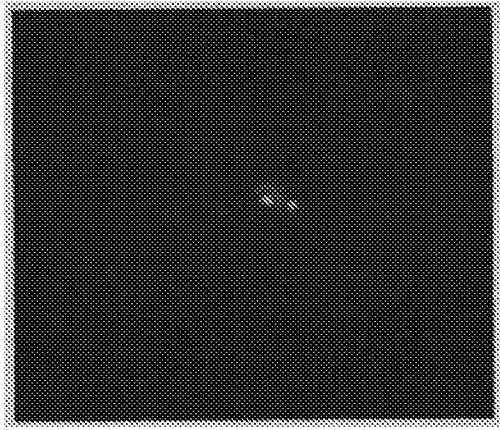


图 3

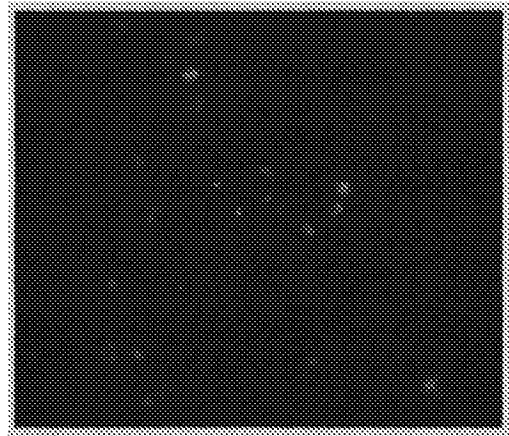


图 4

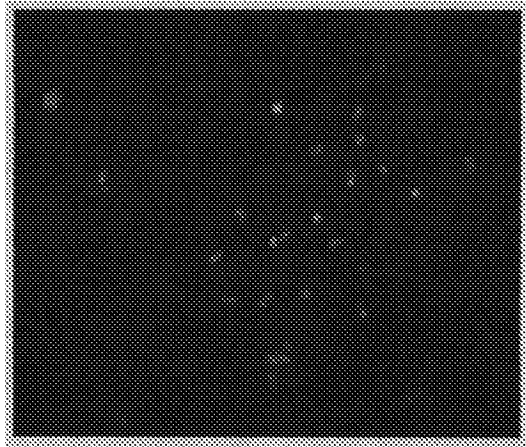


图 5

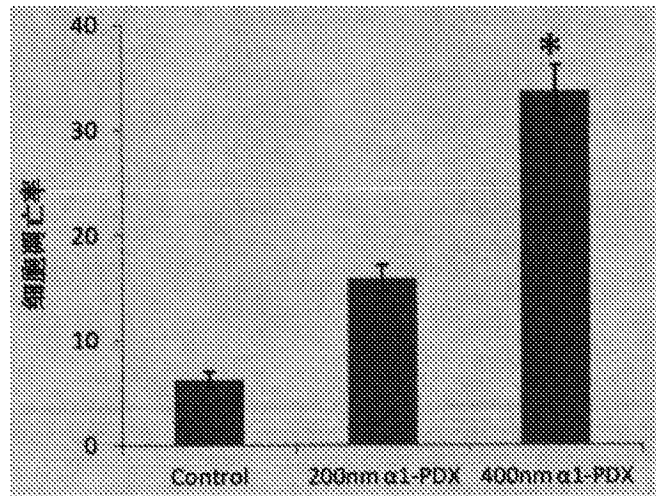


图 6

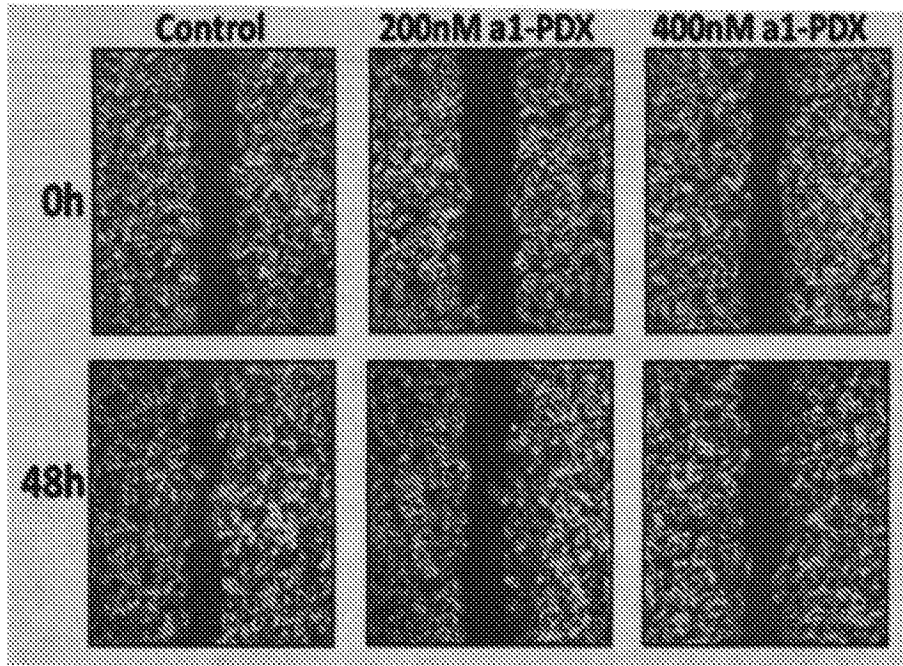


图 7

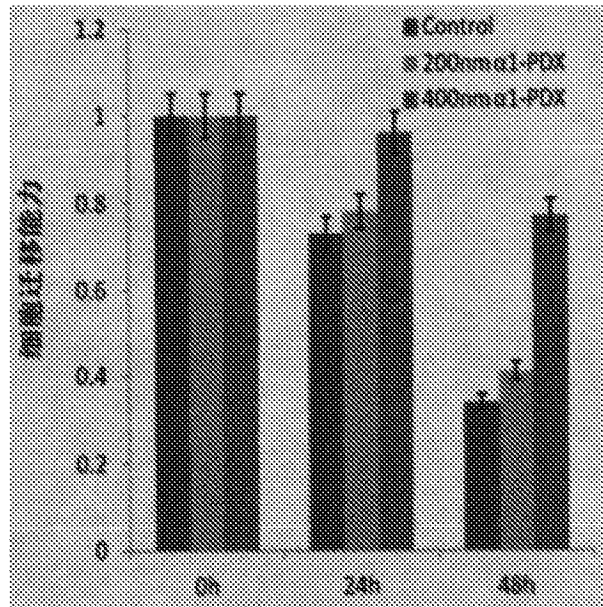


图 8

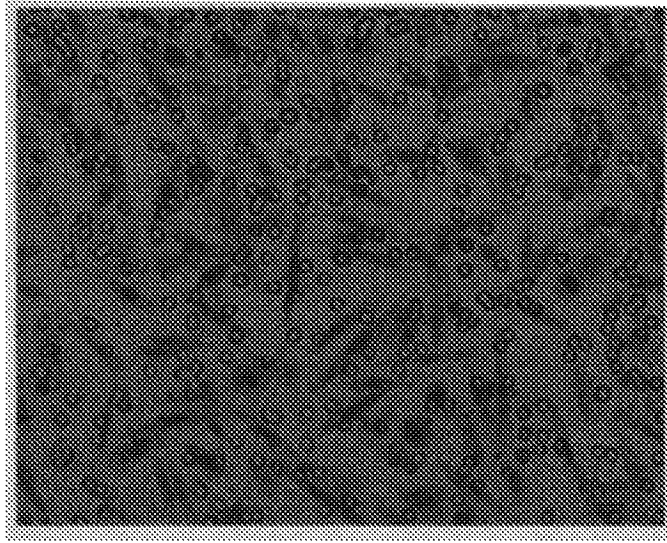


图 9

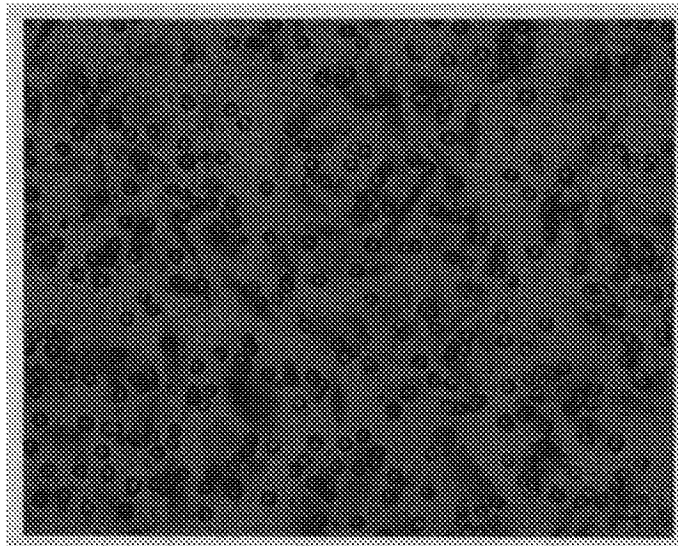


图 10

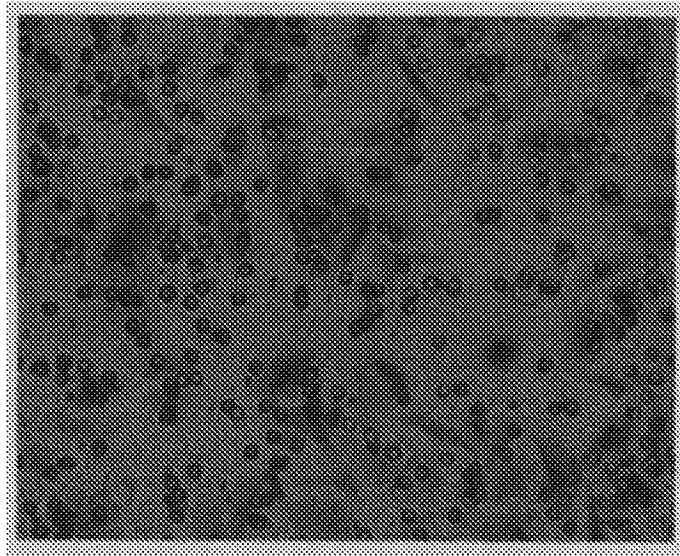


图 11

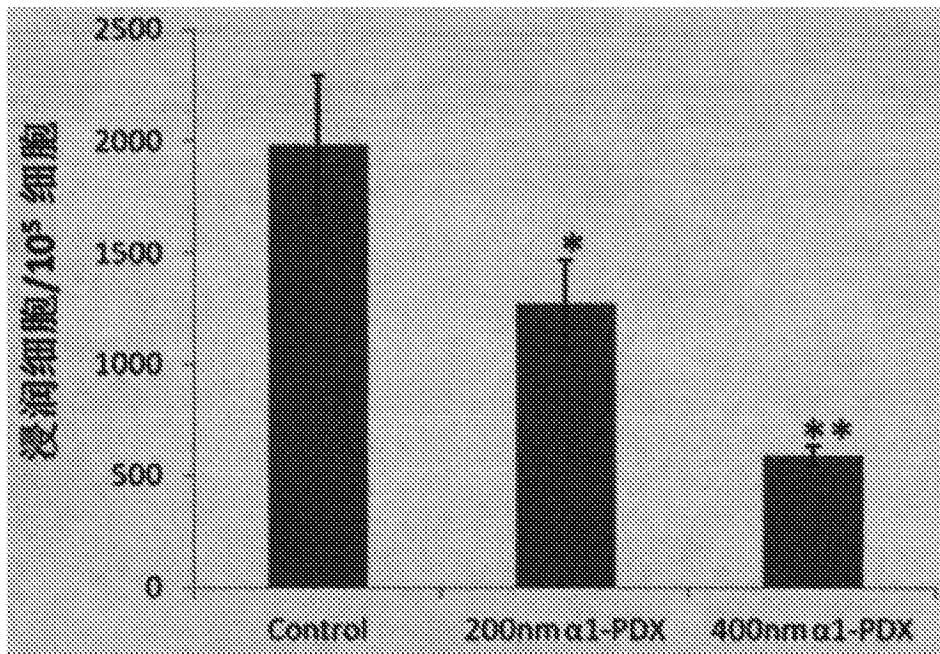


图 12

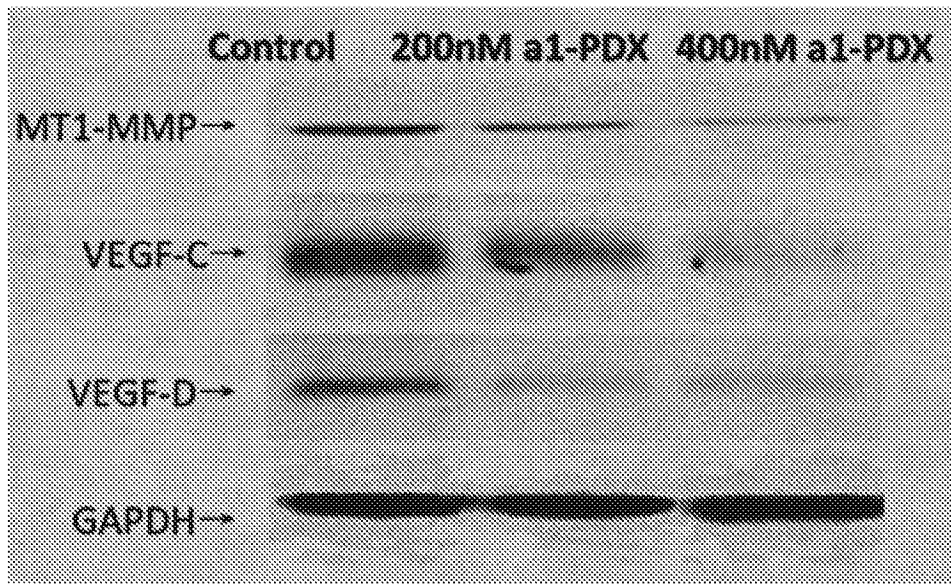


图 13

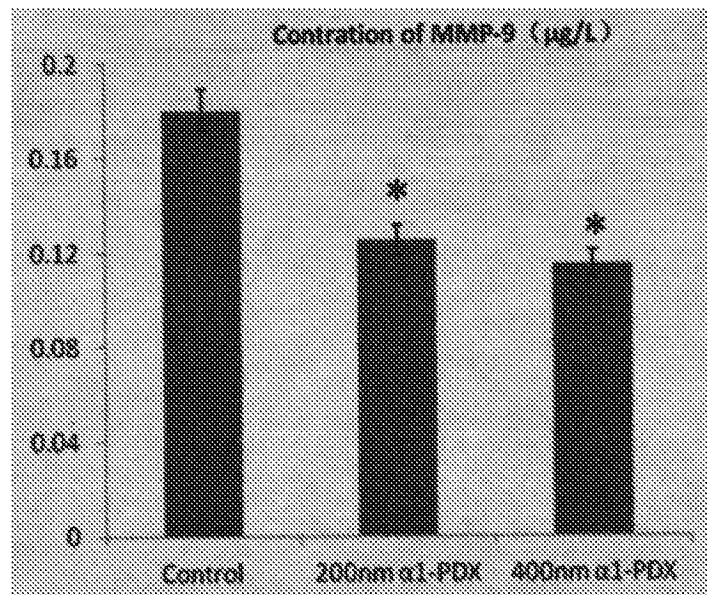


图 14

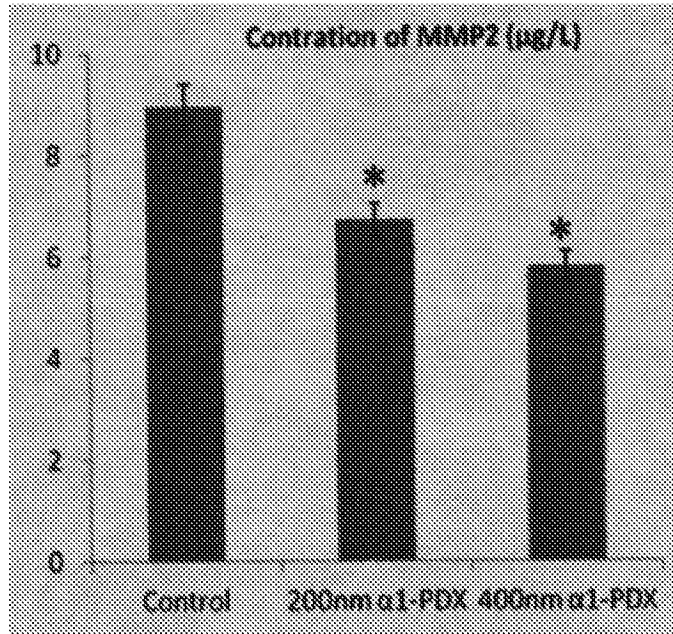


图 15

专利名称(译)	弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法		
公开(公告)号	CN103743909B	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201310653721.8	申请日	2013-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	漯河医学高等专科学校		
申请(专利权)人(译)	漯河医学高等专科学校		
当前申请(专利权)人(译)	漯河医学高等专科学校		
[标]发明人	徐松涛 马永超 刘晓东 范文娟 郭小慧 吴华 李飞		
发明人	徐松涛 马永超 刘晓东 范文娟 郭小慧 吴华 李飞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/6803 G01N2333/81 G01N2800/52		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN103743909A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌细胞生长和转移的影响研究方法，具体包括以下步骤：(1)MTT法检测细胞的增殖；(2)A549细胞克隆形成能力检测；(3)Hochest33342 / PI双染法检测细胞凋亡；(4)单层细胞迁移实验(wound ? healing)；(5)Transwell侵袭实验；(6)Western ? blot检测细胞迁移相关蛋白表达水平；(7)酶联免疫吸附试验；(8)统计分析。本发明通过研究弗林蛋白酶抑制剂对肺腺癌A549细胞生长和转移的影响，可以更好地利用Furin抑制剂a1-PDX抑制Furin在肺腺癌A549细胞中表达，从而有效地为癌症治疗提供依据。

