



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106442956 A

(43) 申请公布日 2017. 02. 22

(21) 申请号 201510489807. 0

(22) 申请日 2015. 08. 11

(71) 申请人 钱朝南

地址 510000 广东省广州市东风东路 651 号

(72) 发明人 钱朝南

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 刘孟斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,本发明利用肿瘤细胞中的 EMT 标志物表达水平的变化,建立一个筛选抗转移化合物的稳定、有效系统,并且可以实现大量化合物的筛选,有利于短期内发现抗转移新药前体,为开发出一系列抗癌新药提供技术解决方案。

1. 一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 构建能定量显示 EMT 过程的肿瘤细胞,测定所述肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量,所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质特性的标志物;

(2) 将待测化合物与所述步骤(1)中的肿瘤细胞共同孵育;

(3) 孵育后,测定步骤(2)中肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量,这里测定的 EMT 标志物与步骤(1)中测定的 EMT 标志物相同;

(4) 将步骤(3)中测定的 EMT 标志物的表达量与步骤(1)中测定的相同 EMT 标志物的表达量进行对比,根据对比结果来判断待测化合物是否为具有抗肿瘤转移作用的化合物;其中如果步骤(3)中代表上皮特性的标志物的表达量高于步骤(1)中相同标志物的表达量,且步骤(3)中代表间充质特性的标志物的表达量低于步骤(1)中相同标志物的表达量,则该待测化合物为具有抗肿瘤转移作用的化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述步骤(1)中代表上皮特性的标志物为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的至少一种。

3. 根据权利要求 1 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述步骤(1)中代表间充质特性的标志物为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的至少一种。

4. 根据权利要求 1 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述步骤(1)和(3)中测定方法均为免疫荧光测定法或荧光蛋白表达水平直接测定法。

5. 根据权利要求 1 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述步骤(2)中孵育时间为 1 ~ 48 小时。

6. 根据权利要求 1 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述步骤(2)中待测化合物与肿瘤细胞共同孵育于多孔板中。

7. 根据权利要求 6 所述的筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,其特征在于,所述多孔板为 24 孔板、96 孔板或 384 孔板。

8. 以 EMT 标志物的表达水平变化作为筛选标准在筛选抗肿瘤转移的化合物中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述的用途,所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质特性的标志物。

10. 根据权利要求 8 所述的用途,其特征在于,所述代表上皮特性的标志物为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的至少一种,所述代表间充质特性的标志物为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的至少一种。

一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种筛选化合物的方法,具体涉及一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法。

背景技术

[0002] 目前大部分癌症患者都死于远处转移。市场上已经开发出来的抗肿瘤药物都是基于它们对肿瘤生长或者对肿瘤血管生成的抑制作用,而对肿瘤转移往往无效。各大制药公司未能开发出用于抑制肿瘤转移的新药,主要瓶颈在于缺乏一个高通量的、可用于筛选抗肿瘤转移化合物的稳定系统。

[0003] 现有的高通量筛选抗癌化合物的基本原理,是通过检测 IC50,即癌细胞的增殖被抑制 50%时的浓度。IC50 的值越低,药物对肿瘤增殖的抑制作用越强。这个旧有的原理无法用于筛选抑制肿瘤转移的新药。因此,我们必须创造出一个全新的筛选抗转移药物的新系统。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术存在的不足之处而提供了一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,本发明还提供了以 EMT 标志物的表达水平变化作为筛选标准在筛选抗肿瘤转移的化合物中的用途。

[0005] 为实现上述目的,所采取的技术方案:一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0006] (1) 构建能定量显示 EMT 过程的肿瘤细胞,测定所述肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量,所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质特性的标志物;

[0007] (2) 将待测化合物与所述步骤(1)中的肿瘤细胞共同孵育;

[0008] (3) 孵育后,测定步骤(2)中肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量,这里测定的 EMT 标志物与步骤(1)中测定的 EMT 标志物相同;

[0009] (4) 将步骤(3)中测定的 EMT 标志物的表达量与步骤(1)中测定的相同 EMT 标志物的表达量进行对比,根据对比结果来判断待测化合物是否为具有抗肿瘤转移作用的化合物;其中如果步骤(3)中代表上皮特性的标志物的表达量高于步骤(1)中相同标志物的表达量,且步骤(3)中代表间充质特性的标志物的表达量低于步骤(1)中相同标志物的表达量,则该待测化合物为具有抗肿瘤转移作用的化合物。

[0010] 肿瘤转移是一个多基因、多阶段、多步骤的过程,其中上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤转移的最开始的步骤,在肿瘤转移中发挥了关键的作用。通过 EMT,肿瘤细胞获得增强的侵袭和运动能力,从而开始侵入导管等转移的后续步骤。所以,EMT 是肿瘤转移的关键一环,可能作为抗肿瘤转移药物筛选的重要标靶。

[0011] 本发明构建定量显示 EMT 过程的肿瘤细胞,以最常见的 EMT 标记物的表达变化作

为检测 EMT 的标准。以这些基因的启动子所驱动的荧光蛋白的表达水平来定量评价 EMT。通过对荧光蛋白表达量进行拍照及定量分析,从而实现高通量筛选抑制或促进 EMT 的化合物和药物。

[0012] 本发明也可以通过直接检测 EMT 蛋白的表达量(例如用免疫荧光的染色方法)来筛选抗转移化合物及药物。

[0013] 优选地,所述步骤(1)中代表上皮特性的标志物为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的至少一种。

[0014] 优选地,所述步骤(1)中代表间充质特性的标志物为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的至少一种。

[0015] 优选地,所述步骤(1)和(3)中测定方法均为免疫荧光测定法或荧光蛋白直接测定法。

[0016] 优选地,所述步骤(2)中孵育时间为 1~48 小时。

[0017] 优选地,所述步骤(2)中待测化合物与肿瘤细胞共同孵育于多孔板中。通过在多孔板中孵育,可以实现同时筛选大量待测化合物,即实现高通量筛选抗肿瘤转移的化合物。

[0018] 优选地,所述多孔板为 24 孔板、96 孔板或 384 孔板。

[0019] 本发明还提供了以 EMT 标志物的表达水平变化作为筛选标准在筛选抗肿瘤转移的化合物中的用途。

[0020] 优选地,所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质特性的标志物。

[0021] 优选地,所述步骤(1)中代表上皮特性的标志物为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的至少一种。

[0022] 优选地,所述步骤(1)中代表间充质特性的标志物为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的至少一种。

[0023] 本发明的有益效果在于:本发明提供了一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法,本发明利用肿瘤细胞中的 EMT 标志物表达水平的变化,建立一个筛选抗转移化合物的稳定、有效系统,并且可以实现大量化合物的筛选,有利于短期内发现抗转移新药前体,为开发出一系列抗癌新药提供技术解决方案。

附图说明

[0024] 图 1 为本发明的实施例 1 中经过两种抗转移处理后裸小鼠肝脏转移结节的形态图;

[0025] 图 2 为本发明的实施例 1 中经过两种抗转移处理后转移结节数量变化图;

[0026] 图 3 为本发明实施例 1 中经过两种抗转移处理后 EMT 标志物的表达水平变化图,图 3 中 A 为间充质标志物 Vimentin 的表达水平变化图,B 为上皮标志物 E-cadherin 的表达水平变化图。

具体实施方式

[0027] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0028] 实施例 1

[0029] 本发明使用了高转移细胞株 S18 建立了脾-肝转移裸鼠模型 (spleen-liver metastasis nude mouse model), 然后分别给予细胞由发明人自行设计的两种抗转移处理 (AM0097 和 AM0098), 约一个月之后同时取出全部动物的肝脏计算转移结节的数目, 如图 1、2 所示, 与对照相比, 统计学上有显著差异, 说明这两种处理都具有抗肿瘤转移的特性。

[0030] 细胞免疫荧光染色实验显示: 两种抗转移处理的 S18 细胞在二维培养时都出现了 EMT 标志物的表达改变: 间充质标志物 Vimentin 的表达量显著减少, 上皮标志物 E-cadherin 表达量显著增加 (scale bar, 50 μ m), 如图 3 所示。上述结果证明了本发明具有坚实的依据: 抗转移化合物可以诱导出现 EMT 标志物的表达改变。

[0031] 实施例 2

[0032] 本发明所述筛选抗肿瘤转移的化合物的方法的一种实施例, 所述方法包括以下步骤:

[0033] (1) 构建能定量显示 EMT 过程的肿瘤细胞, 测定所述肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量, 所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质的标志物; 其中所述代表上皮特性的标志物 (epithelial markers) 为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的一种或多种组合; 所述代表间充质的标志物 (mesenchymal markers) 为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的一种或多种组合, 测定方法为免疫荧光测定法或荧光蛋白直接测定法。

[0034] (2) 将待测化合物与所述步骤 (1) 中的肿瘤细胞共同孵育 1 ~ 48 小时;

[0035] (3) 孵育后, 测定步骤 (2) 中肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量, 这里测定的 EMT 标志物与步骤 (1) 中测定的 EMT 标志物相同;

[0036] (4) 将步骤 (3) 中测定的 EMT 标志物的表达量与步骤 (1) 中测定的相同 EMT 标志物的表达量进行对比, 根据对比结果来判断待测化合物是否为具有抗肿瘤转移作用的化合物; 其中如果步骤 (3) 中代表上皮特性的标志物的表达量高于步骤 (1) 中相同标志物的表达量, 且步骤 (3) 中代表间充质的标志物的表达量低于步骤 (1) 中相同标志物的表达量, 则该待测化合物为具有抗肿瘤转移作用的化合物。

[0037] 实施例 3

[0038] 本发明所述筛选抗肿瘤转移的化合物的方法的一种实施例, 所述方法包括以下步骤:

[0039] (1) 构建能定量显示 EMT 过程的肿瘤细胞, 测定所述肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量, 所述 EMT 标志物包括代表上皮特性的标志物和代表间充质的标志物; 其中所述代表上皮特性的标志物 (epithelial markers) 为 E-Cadherin、Desmoplakin、Cytokeratins、Occludin 和 Claudin 中的一种或多种组合; 所述代表间充质特性的标志物 (mesenchymal markers) 为 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin、Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2、LAMC2 和 Bmi-1 中的一种或多种组合, 测定方法为免疫荧光测定法。

[0040] (2) 把步骤 (1) 中的肿瘤细胞种植于 24 孔板、96 孔板或 384 孔板中, 在细胞贴壁之前或之后, 加入各种化合物, 共同孵育 1-48 小时。

[0041] (3) 孵育后, 测定步骤 (2) 中肿瘤细胞 EMT 标志物的表达量, 这里测定的 EMT 标志

物与步骤(1)中测定的 EMT 标志物相同；

[0042] (4) 将步骤(3)中测定的 EMT 标志物的表达量与步骤(1)中测定的相同 EMT 标志物的表达量进行对比,根据对比结果来判断待测化合物是否为具有抗肿瘤转移作用的化合物;其中如果步骤(3)中代表上皮特性的标志物的表达量高于步骤(1)中相同标志物的表达量,且步骤(3)中代表间充质特性的标志物的表达量低于步骤(1)中相同标志物的表达量,则该待测化合物为具有抗肿瘤转移作用的化合物。

[0043] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

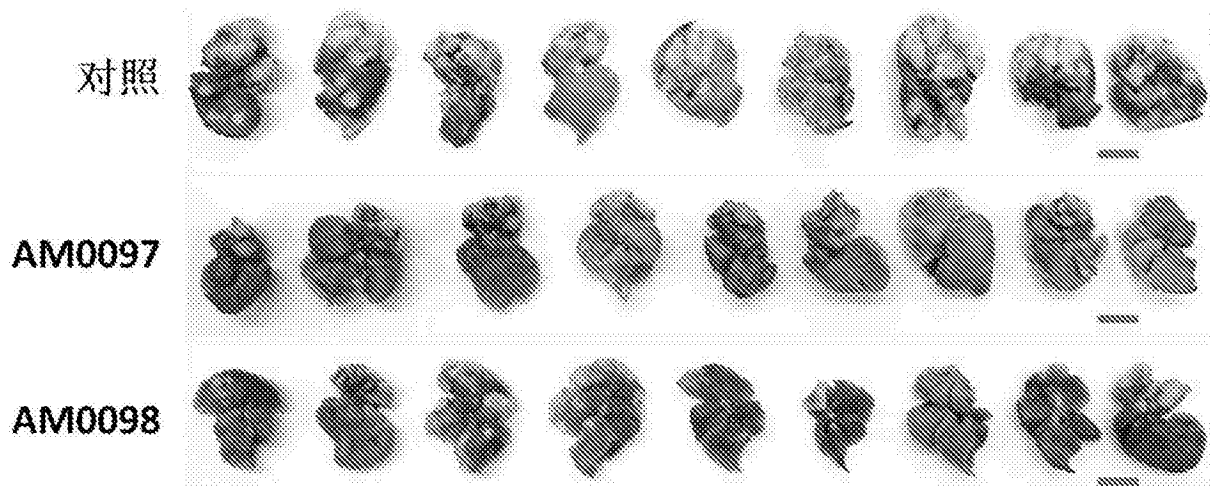


图 1

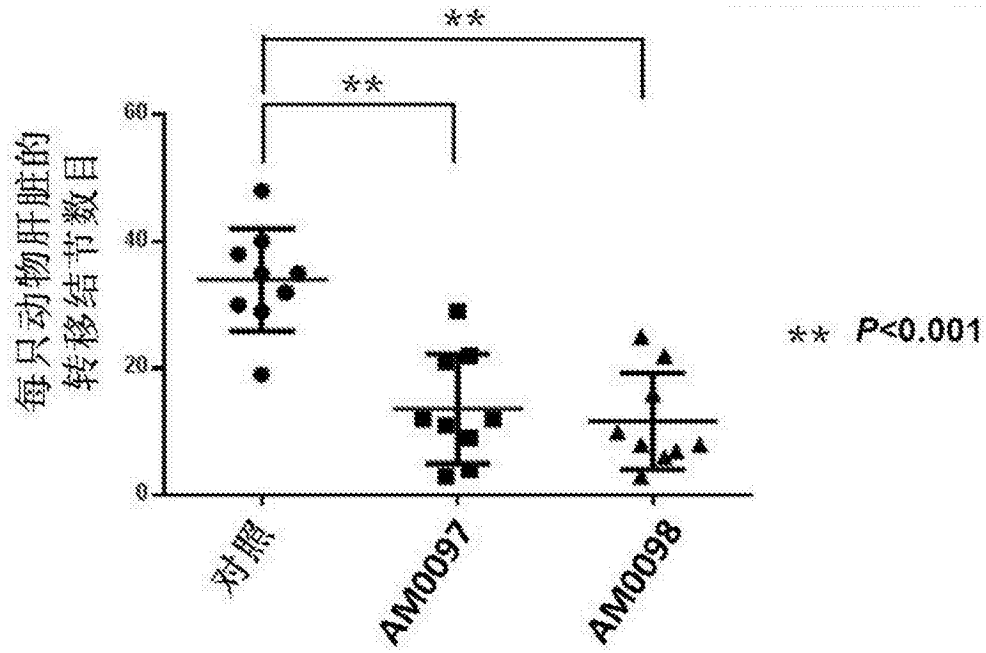


图 2

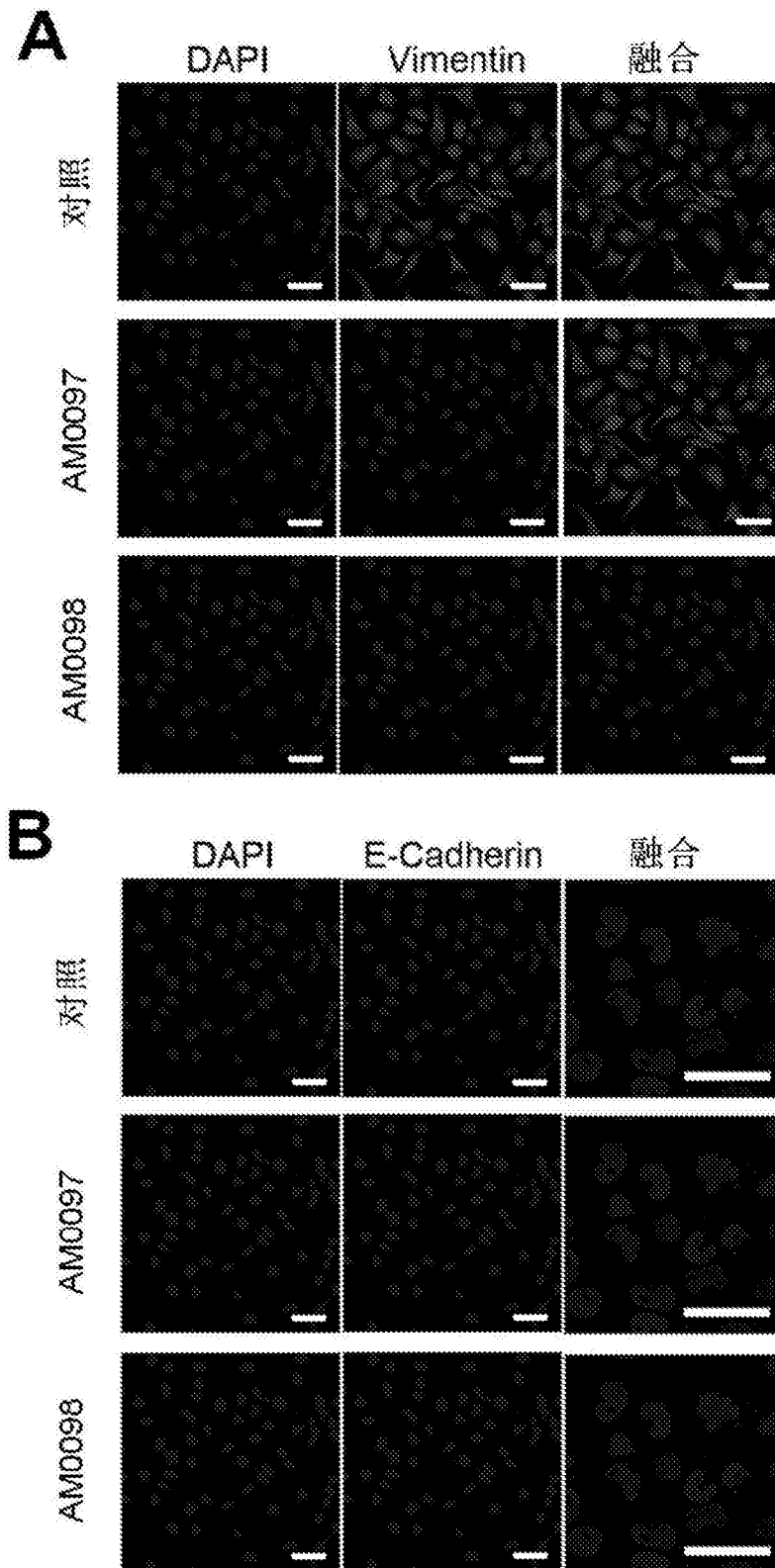


图 3

专利名称(译)	一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法		
公开(公告)号	CN106442956A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201510489807.0	申请日	2015-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	钱朝南		
申请(专利权)人(译)	钱朝南		
当前申请(专利权)人(译)	钱朝南		
[标]发明人	钱朝南		
发明人	钱朝南		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种筛选抗肿瘤转移的化合物的方法，本发明利用肿瘤细胞中的EMT标志物表达水平的变化，建立一个筛选抗转移化合物的稳定、有效系统，并且可以实现大量化合物的筛选，有利于短期内发现抗转移新药前体，为开发出一系列抗癌新药提供技术解决方案。

