



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102302483 A

(43) 申请公布日 2012.01.04

(21) 申请号 201110190438.7

(22) 申请日 2011.07.08

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 张春玲 魏秀莉 黄峰 曾文峰
金凌涛 梁伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

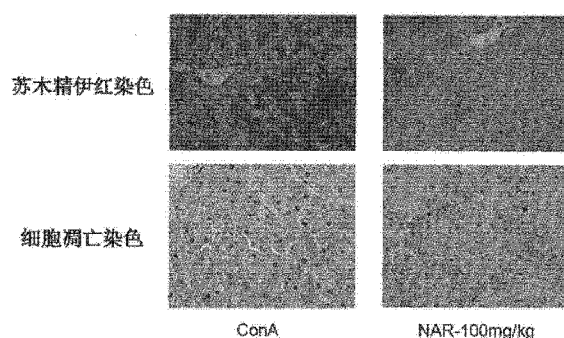
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 8 页

(54) 发明名称

黄酮类小分子药物在抗炎及相关疾病中的应用

(57) 摘要

本发明通过对黄酮类小分子化合物在炎症反应中,对相关的细胞炎症因子的调控机制和细胞内分子水平调控机制的阐明,开发出一种黄酮类小分子药物(包括柚皮素、橙皮素、木犀草素、及芹菜素等)在制备抗炎和与炎症相关的疾病的药物中的全新的应用。所述的与炎症相关的疾病为:实体性高转移型肿瘤(包括肺癌、肝癌及乳腺癌,系统性器官纤维化(包括肺纤维化、肝纤维化),放化疗引起的肺损伤及放化疗引起的肺纤维化等。



1. 黄酮类小分子化合物在制备通过调控细胞炎症因子的分泌量,以达到抑制炎症和与炎症相关的疾病的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于所述的黄酮类小分子化合物为:柚皮素、橙皮素、木犀草素、及芹菜素。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于所述的与炎症相关的疾病为:实体性高转移型肿瘤(包括肺癌、乳腺癌、肝癌),系统性器官纤维化(包括肺纤维化、肝纤维化),放化疗引起的肺损伤等。
4. 根据1权利要求1所述的应用,其特征在于所述的调控细胞炎症因子的分泌量是指,在黄酮类小分子化合物的作用下,炎症因子在细胞外的分泌量发生显著降低。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于所述的炎症因子在细胞外的分泌量发生显著降低的细胞分子途径是:在黄酮类小分子化合物的作用下,炎症因子在转录、翻译后,由细胞内向细胞外分泌运输的途径,特别是经由高尔基体向细胞膜的运输途径受到严重抑制。
6. 根据权利要求1-4任一所述的应用,其特征是,所述药物是以黄酮类小分子化合物为有效成分,加入常规辅料,通过常规工艺制备获得的片剂、胶囊剂、注射剂、散剂、颗粒剂、混悬剂等。
7. 根据权利要求1所述的应用,其特征是,所述的细胞炎症因子包括:TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-2、IL-1、IL-5、IL-17A。

黄酮类小分子药物在抗炎及相关疾病中的应用

技术领域

[0001] 本申请涉及一种黄酮类小分子药物在抗炎及相关疾病中的应用,特别是黄酮类小分子药物在抗炎和与炎症相关的糖尿病、肿瘤、纤维化疾病中的应用。

背景技术

[0002] 炎症是指机体对外界刺激的一种有序的反应。这种外界刺激可以是来自病原体的感染入侵,也可以是组织器官的机械损伤。肺纤维化、类风湿性关节炎、二型糖尿病以及肿瘤等疾病,均伴随着程度不同的炎症反应,以至于这类疾病病因复杂,难以治疗。此外,即使是感染类疾病,也有许多爆发性炎症过程的机制仍不明确,治疗手段匮乏。再者,许多炎症类疾病,特别是慢性炎症,起因并不是由于感染或是机械损伤造成的。事实上,这类疾病有可能是由于机体的正常组织功能紊乱导致的。因此,炎症这一发现已有上千年历史的生理病理过程仍需不断深入了解,并进一步提供新的治疗手段,以帮助包括糖尿病、癌症、纤维化在内的多种疾病的患者获得更好的治疗和愈后效果。

[0003] 炎症反应本身具有非常重要的生理意义。但是,如若对其不加以调控则会导致严重的病理结果,例如组织损伤、器官衰竭甚至机体死亡。急性炎症反应可以促进组织的损伤修复,但这一过程同样也可以损伤甚至破坏组织器官,更进一步的,这种情况会因为随之而来的慢性炎症反应而加重。慢性炎症过程与很多种疾病有关,例如自身免疫疾病,动脉粥样硬化,糖尿病以及癌症。这一过程通常是由于机体正常的反馈机制出现障碍,以至于对某一遗传的或外来的刺激持续反应,进而造成功能障碍以及机体损伤。可见,炎症反应具有正负两方面作用——在清除病原微生物的同时不可避免地损伤正常细胞或组织。在正常情况下,机体存在严格的调控机制。但当炎症反应某些环节出现调控异常,则会导致炎症反应失控,进而演变成炎症或自身免疫类疾病。因此,对于整个炎症过程调控机制的深入研究具有重要的临床意义。

[0004] 由于细胞因子在炎症过程中扮演着十分重要的角色,因此,对细胞因子的调控长期以来一直是抗炎类药物研发的热点方向。近年来,许多蛋白类药物已被广泛应用治疗多种炎症类和自身免疫类疾病。这些蛋白类药物大部分为细胞因子或其受体的特异性中和抗体。它们在许多炎症和自身免疫性疾病如类风湿性关节炎,病原体休克,牛皮癣,肠炎等的治疗中已占有一席之地。诚然,中和某一特定的细胞因子的确能够显著影响炎症反应过程并产生明确的疗效;但是这一类药物也存在明显的不足之处,例如降低了免疫系统的防御能力、价格昂贵、必须注射给药等。

[0005] 此外,细胞因子受体下游信号通路中的一些关键的激酶也日益成为炎症研究的热点领域,针对这些激酶的特异性小分子抑制剂很有希望成为新一代的抗炎药物,如 NF- κ B、JNK、P38MAPK 的特异性抑制剂以及组氨酸去乙酰化酶的特异性抑制剂。另外,广泛使用的降脂类药物他汀类也具有一定的抗炎活性。然而,由于许多细胞内信号分子均参与机体正常的生理功能,因此这些小分子抑制剂不可避免的地会导致较大的体内毒性。如何在保持疗效的基础上降低器官毒性减少药物副作用正成为抗炎类药物的研发热点。鉴于许多细胞

因子都具有多层次的调控模式——转录水平调控和转录后调控,并且转录后调控相比转录前调控特异性更强,因此转录后调控的某些机制将有望成为新的抗炎药物靶点。

[0006] 黄酮类化合物 (flavonoids) 是一类存在于自然界的、具有 2- 苯基色原酮 (flavone) 结构的化合物。它们分子中有一个酮式羰基,第一位上的氧原子具碱性,能与强酸成盐,其羟基衍生物多具黄色,故又称黄碱素或黄酮。黄酮类化合物的发现和药用历史十分悠久,早在上世纪 30 年代初,即有报道通过乙醇提取柠檬皮获得由黄酮组成的混合物柠檬素对于败血症有很好的治疗和预防效果。时至今日,在多个领域都有使用黄酮类化合物作为治疗和预防药物的报道和研究,例如芦丁、槲皮素、葛根素等有明显的扩冠作用;木犀草素、黄芩苷、黄芩素等有一定的抗菌作用;槲皮素、二氢槲皮素、桑色素、山柰酚等具有抗病毒作用等等,对于黄酮类化合物的抗炎、抗肿瘤效果,也有很多报道。但是,正如上文所述,炎症的发展、调控过程涉及到大量细胞因子的多级别的变化、反馈,而急慢性炎症环境和肿瘤、纤维化、糖尿病等疾病的伴生、恶化也有直接的关联,因此,通过药物对炎症反应在分子水平进行更为精细的调控,对于这些疾病的治疗、预后有重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明通过对黄酮类小分子化合物在炎症反应中,对相关的细胞炎症因子的调控机制和细胞内分子水平调控机制的阐明,开发出一种黄酮类小分子药物在制备抗炎和与炎症相关的疾病的药物中的全新的应用。

[0008] 本发明所述的黄酮类小分子化合物为:柚皮素、橙皮素、木犀草素、及芹菜素等。

[0009] 本发明所述的与炎症相关的疾病为:实体性高转移型肿瘤(包括肺癌、肝癌及乳腺癌,系统性器官纤维化(包括肺纤维化、肝纤维化),放化疗引起的肺损伤及放化疗引起的肺纤维化等。

[0010] 本发明所述的黄酮类小分子化合物在炎症反应中对相关细胞炎症因子的调控机制是指,在黄酮类小分子化合物的作用下,炎症因子在细胞外及血清中的分泌量发生显著降低。

[0011] 本发明所述的黄酮类小分子化合物在炎症反应中对相关细胞炎症因子的细胞内分子水平调控机制是指,黄酮类小分子化合物的作用下,炎症因子在转录及翻译水平均不受影响,但是转录、翻译后,由细胞内向细胞外分泌运输的途径,特别是经由高尔基体向细胞膜的运输途径受到严重抑制。

[0012] 本发明所述的细胞炎症因子包括:TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-2、IL-1、IL-5、IL-17A。

[0013] 本发明所述的黄酮类小分子化合物的制剂是指,以黄酮类小分子化合物为有效成分,加入常规辅料,通过常规工艺制备获得的片剂、胶囊剂、注射剂、散剂等。

附图说明

[0014] 图 1. 柚皮素对 ConA 诱导肝损伤小鼠血清中 ALT(谷丙转氨酶)(图 1a) 及 AST(谷草转氨酶)(图 1b) 的影响, ConA-Nar-50mg 表示柚皮素中剂量治疗组(给药剂量:50mg/kg), ConA-Nar-100mg 表示柚皮素高剂量治疗组(给药剂量:100mg/kg)。

[0015] 图 2. 柚皮素有效缓解 ConA 诱导的急性肝损伤,对 ConA 造模小鼠肝脏组织切片

H&E 染色及 TUNEL 原位凋亡染色实验,使用柚皮素治疗前后的照片。

[0016] 图 3. 柚皮素对肝组织淋巴细胞数量的影响,柚皮素给药剂量 :100mg/kg。

[0017] 图 4. 柚皮素抑制 ConA 诱导的急性细胞因子释放,柚皮素剂量 :100mg/kg。

[0018] 图 5. 柚皮素显著抑制 LPS 诱导的急性炎症反应,使用细胞因子磁珠阵列分析 (CBA) 法检测用 LPS 刺激后的小鼠和先用 LPS 刺激后给予 Nar 治疗的小鼠 (给药剂量为 100mg/kg 或 200mg/kg,给药时间为 2h 或 6h) 血清中 IL-6(白介素 6,图 5b)、TNF- α (肿瘤坏死因子- α ,图 5a、c)、IFN- γ (干扰素 γ ,图 5e)、IL-1(白介素 1,图 5d)、IL-5(白介素 5,图 5g)、IL-17A(白介素 17A,图 5f) 等细胞因子的含量。

[0019] 图 6. 柚皮素抑制 LPS 刺激腹腔巨噬细胞向细胞外分泌 TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 和 IL-6(白介素 6),柚皮素的加入 (浓度 :100 μ M) 可以显著抑制 TNF- α (图 6b) 和 IL-6(图 6a) 的分泌。

[0020] 图 7. 柚皮素抑制 CD4T 细胞所分泌的 TNF- α (图 7b) 和 IFN- γ (图 7a),用 CD3 和 CD28 的抗体特异性激活的 T 细胞大量分泌 TNF- α 和 IFN- γ ,加入柚皮素 (50 μ M、100 μ M) 能够抑制 T 细胞分泌细胞因子的能力。

[0021] 图 8. 柚皮素抑制 TLR1,TLR3,TLR5,TLR9 激动剂所诱导的细胞因子分泌,使用 TLR1 激动剂 Pam3CSK4(细菌脂蛋白氨基末端乙酰化产物类似物,购自 InvivoGen),TLR3 激动剂 Poly(I:C)(双链 RNA 合成类似物,购自 InvivoGen),TLR5 激动剂 Flagellin(细菌鞭毛,购自 InvivoGen),TLR9 激动剂 CpG(寡聚核苷酸,购自 InvivoGen) 刺激巨噬细胞,检测其分泌的细胞因子的量,然后检测柚皮素 (50 μ M、100 μ M) 对于上述激活剂刺激巨噬细胞分泌细胞因子 TNF- α (图 8a) 和 IL-6(图 8b) 的影响。

[0022] 图 9. 柚皮素不影响早期 NF- κ B 的激活,柚皮素处理也不影响早期 (LPS 刺激 20,40 分钟) I κ B α (核转录因子激酶抑制蛋白) 的磷酸化水平 (P-I κ B α) 的免疫印记实验数据见图 10a,以及核转录因子亚基 P65/P50 的 DNA 结合活性,见图 10b。

[0023] 图 10. 柚皮素不影响 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的 mRNA 水平,LPS 刺激原代巨噬细胞后,加入柚皮素,Q-PCR(定量聚合酶链式反应) 考察 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 水平 (图 10a、b),在 LPS 加入 2 小时后通过 RNA 合成酶抑制剂 Actomycin D(放线菌素 D) 来阻断新 mRNA 的合成,考察柚皮素对细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 稳定性的影响 (图 10c、d)。

[0024] 图 11. 柚皮素减少胞外 TNF- α ,但不影响 TNF- α 翻译量,Brefeldin A 阻断 TNF- α 的分泌时,柚皮素显著减少细胞外 TNF- α 水平 (图 11a),但对胞内的 TNF- α 没有任何影响 (图 11b)。

[0025] 图 12. 柚皮素不影响 LPS 作用后细胞内 TACE 酶的活性。

[0026] 图 13. 柚皮素治疗博来霉素引起肺损伤的病理切片照片,经柚皮素灌胃给药 (给药剂量 100mg/kg) 治疗组、未治疗组、以及阳性对照组 (给药醋酸泼尼松龙) 的大鼠肺组织病理学染色照片。

[0027] 图 14. 柚皮素灌胃给药 (200mg/kg、400mg/kg) 治疗由放射照射引起的大鼠肺组织与阳性对照组 (地塞米松 0.5mg/kg)、未治疗组的大鼠肺组织病理染色照片。

[0028] 图 15. 柚皮素 (200mg/kg)、橙皮素 (200mg/kg)、木犀草素 (200mg/kg) 及芹菜素 (200mg/kg) 对小鼠乳腺癌 4T1 转移到肺组织的治疗效果

具体实施方式

[0029] 实验材料：

[0030] ConA(刀豆蛋白,购自Sigma-Aldrich)、LPS(脂多糖,购自Sigma-Aldrich);TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自 Millipore;天冬氨酸氨基转移酶 (ALT),丙氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒购自中生北控生物试剂股份有限公司;TNF- α (肿瘤坏死因子- α), IFN- γ (干扰素 γ), IL-6(白介素 6), IL-2(白介素 2), TGF- β (转化生长因子 β) 的 ELISA 试剂盒均购自 eBioscience 公司;凋亡检测试剂盒以及小鼠辅助 T 细胞 1/2(Th1/Th2CBA) 试剂盒均购自 Bender MedSystems 公司;anti-CD3,anti-CD28,APC-anti-TNF- α , PE-anti-IL-6,PE-anti-IFN- γ , APC-anti-IL-2, FITC-anti-CD4, Percp-CY5.5-anti-CD8, PITC-anti-F4/80 抗体均购自 eBioscience 公司;小鼠 anti-Fas 抗体 (Jo2) 购自 BD Bioscience;柚皮素,购自陕西惠科有限公司,纯度 > 98%;HPMC(羟丙基甲基纤维素) 国产分析纯;其余试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司或国产分析纯。

[0031] 动物：

[0032] 18-20g 体重的雌性 Balb/c 及 18-20g 体重的雌性 C57BL/6 小鼠以及 Wistar 大鼠,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验前于 P1 级别动物室适应 1 周。

[0033] 实施例 1. 柚皮素 (Nar) 对刀豆蛋白 (ConA) 诱导的小鼠急性肝损伤模型的保护作用

[0034] 将体重为 18-20g 的雌性 Balb/c 小鼠随机平均分为以下 5 组:①正常对照 (Normal);②模型对照 (Control,给等剂量的生理盐水);③柚皮素高剂量治疗组 (给药剂量:100mg/kg);④柚皮素中剂量治疗组 (给药剂量:50mg/kg);⑤柚皮素低剂量治疗组 (给药剂量:50mg/kg)。实验首日开始,治疗组灌胃给予柚皮素,未治疗组 (即正常对照组) 灌胃给予等容量溶剂 (HPMC,0.1ml/10g 体重),每日 1 次,连续 3 天。实验第 4 天,模型对照组和各治疗组用含 ConA 的 PBS 溶液以 15mg/kg 剂量,尾静脉注射小鼠,给药 (注射 ConA) 1 次建立肝损伤模型。ConA 注射后 3 小时、6 小时、9 小时以及 18 小时眼眶静脉取血分离血清,检测 IL-6(白介素 6)、TNF- α (肿瘤坏死因子- α)、IFN- γ (干扰素 γ)、IL-2(白介素 2)、ALT、AST,然后处死小鼠,剥离肝脏。部分肝脏使用 10% 中性福尔马林固定,做病理切片,进行 H&E 染色及 TUNEL 原位凋亡检测。另一部分肝组织经剪切、研磨,制成单细胞悬液,磷酸盐缓冲液漂洗 1 次,70 μ m 细胞滤器去除细胞碎片,ACK(红细胞裂解液)裂解红细胞,HBSS 溶液洗 1 次,重悬于 35% Percoll(梯度离心介质),缓慢滴加到 70% Percoll 上,2500rpm 离心 20min,收集夹层中的单核细胞。分别使用 FITC-偶联的抗-CD4 抗体 (FITC-anti-CD4)、Percp-cy5.5-偶联的抗-CD8 抗体 (Percp-CY5.5-anti-CD8)、PE-偶联的抗-CD49b (PE-anti-CD49b) 进行抗体染色,通过流式细胞仪分别检测 CD4⁺T 细胞, CD8⁺T 细胞以及 NK 细胞亚群比例。血清中的细胞因子水平使用细胞因子磁珠阵列分析 (CBA) 及 ELISA 法进行检测,使用紫外分光光度计检测血清中 AST 和 ALT。

[0035] 肝脏受损时,肝细胞发生凋亡时会大量 ALT、AST 直接释放入血液。因此,血清中的 ALT 以及 AST 活性直接反应了肝脏的受损程度。ConA 造模小鼠血清 ALT 和 AST 分别为 1769.28U/L 和 1474.4U/L,分别是正常小鼠的 53.8 和 21.7 倍,表明 ConA 造成了严重的肝损伤;柚皮素治疗的小鼠与未治疗的小鼠比较,血清中的 ALT 及 AST 降低显著 (图 1)。

[0036] 肝组织切片 H&E 染色显示,ConA 造模小鼠肝脏组织受损严重,由中央静脉向四周

呈严重的放射性损伤；柚皮素治疗组与模型对照组相比，肝脏组织相对均一，损伤程度有明显改善，炎症较轻（图 2）；TUNEL 原位凋亡实验结果表明，ConA 可以诱发小鼠肝细胞的大面积凋亡，而经柚皮素治疗后的小鼠肝细胞凋亡程度明显减轻（图 2）。

[0037] 在 ConA 诱导的急性肝损伤模型中，机体免疫系统扮演着十分重要的角色。正是由于 CD4⁺T 细胞、自然杀伤 T 细胞 (NKT) 以及 Kupffer cell (肝脏内的一种巨噬细胞) 的非正常激活，大量募集至肝脏并过量分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-12 等细胞因子，造成肝脏的急性炎症及相应的破坏性损伤。通过流式细胞术考察上述肝脏 T 细胞和 NK 细胞的浸润情况的结果显示：相比 ConA 模型对照组，柚皮素 100mg/kg 和 200mg/kg 治疗组募集至肝脏的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞以及 NK 细胞的数量大量减少（图 3）。

[0038] 在急性肝损伤中，免疫细胞激活后随即大量释放 IFN- γ 及 TNF- α 等细胞因子。这些细胞因子不仅可以直接诱导肝细胞凋亡，还能够诱导免疫细胞的功能分化，加强炎症反应。使用酶联免疫吸附的方法考察血清中的 IFN- γ 的表达，发现相比 ConA 模型对照组，柚皮素治疗组可以显著降低 IFN- γ 的水平（图 4）。

[0039] 实施例 2. 柚皮素对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠急性炎症模型的保护作用

[0040] LPS 是革兰氏阴性菌胞壁内毒素的主要成分，也是革兰阴性菌诱发宿主免疫应答导致急性炎症及脏器损伤的主要因素。LPS 可以被巨噬细胞或中性粒细胞等免疫细胞表面的 toll 样受体 4 (TLR-4) 所识别，进而激活 TLR 信号转导通路，启动下游包括 TNF- α 和 IL-6 等在内的多种蛋白表达。其最终目的是为了启动炎症反应，用以清除外来病原体。但是，过多 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 等炎症因子所带来的“细胞因子风暴”会导致脓毒症 (Sepsis) 和内毒素血症 (Endotoxemia)，严重时会引起多器官衰竭和甚至机体死亡。

[0041] 将体重为 18-20g 的雌性 C57BL/6 小鼠随机平均分为以下 4 组：①正常对照 (Normal)；②模型对照 (Control)；③柚皮素高剂量治疗组 (Nar 给药剂量：200mg/kg)；④柚皮素低剂量治疗组 (Nar 给药剂量：100mg/kg)。实验首日开始，治疗组灌胃给予柚皮素，未治疗组（即正常对照组）灌胃给予等容量溶剂 (0.1ml/10g 体重)，每日 1 次，连续 3 天。实验第 4 天，模型对照组和治疗组用 LPS 的 PBS 溶液以 10mg/kg 剂量腹腔注射小鼠，给予 1 次建立系统性炎症模型。分别于 LPS 注射 2 小时和 6 小时后眶静脉取血分离血清，使用 CBA 及 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的表达水平。

[0042] 使用细胞因子磁珠阵列分析 (CBA) 检测血清中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-5、IL-17A (白介素 17A) 等细胞因子。结果显示，在 LPS 刺激下小鼠血中的细胞因子表达水平明显升高，而柚皮素治疗则能够不同程度地减少这些细胞因子的表达（图 5）。本实验说明柚皮素的确能够抑制 LPS 所致的急性炎症反应，减轻“细胞因子风暴”的进程。

[0043] 实施例 3. 柚皮素抑制巨噬细胞和 T 细胞分泌急性炎症因子

[0044] 上述实施例 1-2 表明，柚皮素的作用能够显著的降低器官、组织中的炎症因子和细胞因子的水平，并对 ConA 和 LPS 诱导的小鼠炎症模型有明显的保护作用。

[0045] LPS 诱导的急性炎症和 ConA 诱导的急性肝损伤分别是由巨噬细胞和 T 细胞介导的，而细胞因子的胞外分泌过程不仅是巨噬细胞和 T 细胞最重要的功能之一，也是导致上述急性炎症和脏器损伤的重要诱因。因此，考察柚皮素对于上述巨噬细胞和 T 细胞的急性炎症因子的细胞分泌过程。

[0046] 使用 LPS 刺激原代培养的巨噬细胞，并同时加入柚皮素，在不同时间点收取细胞

培养上清,使用 ELISA 法检测上清中的 TNF- α 和 IL-6 表达水平,以此来考察柚皮素对巨噬细胞细胞因子分泌的影响。结果表明,LPS 能够激活巨噬细胞,进而分泌大量 TNF- α 和 IL-6,并且随着激活时间的延长,分泌量逐渐增多;而柚皮素(100 μ M)则可以显著抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌(图 6)。

[0047] 同样,使用磁珠系统分离脾脏 CD4⁺T 细胞,利用 CD3 抗体(anti-CD3)和 CD28 的抗体(anti-CD28)特异性激活 T 细胞,同时加入柚皮素考察其对 T 细胞的作用。结果证明,柚皮素同样能够抑制 T 细胞分泌细胞因子的能力(图 7)另外,为了排除柚皮素对巨噬细胞和 T 细胞的非特异性杀伤,我们使用流式细胞术考察柚皮素对这两种细胞的细胞毒作用。结果证明,柚皮素在 100 μ M 浓度下并不影响细胞的存活能力。

[0048] 实施例 4. 柚皮素通过转录后调控机制抑制炎症因子由胞内向胞外分泌

[0049] 为了进一步研究柚皮素的具体作用机制,我们以体外 LPS 刺激巨噬细胞为研究模型,重点考察柚皮素对 TNF- α (肿瘤坏死因子 α)的表达与分泌的影响。

[0050] 当炎症反应启动后,TNF- α (肿瘤坏死因子 α)是最先产生的细胞因子。它可以迅速激活核转录因子(NF- κ B)信号通路,诱导其他多种效应分子的表达。因此,TNF- α 在介导炎症反应过程中具有中心作用。当外源病原体(如细菌)进入机体后,其细胞壁组分 LPS 可以被巨噬细胞表面的 TLR4 所识别,进而启动 TLR4 信号转导通路,激活下游细胞因子的表达。此外,机体还进化出一系列 TLR 受体家族,用以识别从细菌到病毒等多种外源微生物。首先,我们考察柚皮素是否对其他 TLR 受体信号转导通路具有抑制作用。我们使用 TLR1 激活剂 Pam3CSK4(细菌脂蛋白氨基末端乙酰化产物类似物,InvivoGen)、TLR3 激活剂 Poly(I:C)(双链 RNA 合成类似物,InvivoGen)、TLR5 激活剂 Flagellin(细菌鞭毛,InvivoGen)和 TLR9 激活剂(CpG,InvivoGen)分别刺激巨噬细胞,发现柚皮素能够抑制多种 TLR 所介导的细胞因子表达(图 8)。此结果说明柚皮素对多种 TLR 信号通路具有抑制作用,因此其作用靶点可能位于膜上 TLR 受体下游。

[0051] 当细胞表面的 TLR4 被激活后,会通过一系列信号级联反应,用以激活 NF- κ B、等炎症通路,进而启动下游基因的表达。因此,通过免疫印记法,我们发现柚皮素处理不影响早期(LPS 刺激 20,40 分钟,见图 9)核转录因子激酶抑制蛋白的磷酸化以及该蛋白的亚基 P65/P50 的 DNA 结合活性(图 9)。同时,我们也观察到柚皮素在一定程度上会抑制后期(LPS 刺激 1 小时后)NF- κ B 的激活(图 9)。因为早期 NF- κ B 的激活会诱导表达 TNF- α ,分泌到胞外的 TNF- α 会通过 TNF- α 受体反过来再次激活 NF- κ B 通路,以维持炎症反应持续进行。所以,柚皮素对后期 NF- κ B 激活的抑制作用是抑制 TNF- α 分泌的间接结果。

[0052] TNF- α 的表达是具有不同层次的多种调控方式,包括基因表达水平调控、mRNA 稳定性调控、mRNA 转运调控、蛋白翻译调控、蛋白细胞内转运调控、膜上释放调控等。因此,我们首先考察柚皮素对 TNF- α 基因达的影响。我们使用 LPS 刺激原代巨噬细胞,并同时加入柚皮素,2 小时后通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)实验考察 TNF- α 的 mRNA 水平。结果发现,柚皮素并不影响 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的 mRNA 水平(图 10a、b)。此外,我们在 LPS 加入 2 小时后通过 RNA 合成酶抑制剂放线菌素 D(Actomycin D)来阻断新 mRNA 的合成,考察柚皮素对细胞因子 mRNA 稳定性的影响。结果显示,与 LPS 对照组相比,柚皮素处理组细胞因子 mRNA 的半衰期没有任何改变(图 10c、d)。此结果说明柚皮素对 TNF- α 的抑制作用是通过转录后调控机制实现的。

[0053] 布雷菲德菌素 A (Brefeldin A) 是一种内质网向顺面高尔基体的蛋白转运抑制剂, 它可以有效阻断包括 TNF- α 在内的多种分泌型蛋白的胞内转运, 但并不影响其生物合成。因此, 我们使用布雷菲德菌素 A 阻断 TNF- α 的胞内转运, 发现在布雷菲德菌素 A 作用下, 细胞内则累积了大量的 TNF- α (图 11); 但在这种情况下, 柚皮素显著减少细胞外 TNF- α 水平 (图 11), 但对胞内的 TNF- α 没有任何影响 (图 11)。此结果说明柚皮素并不影响 TNF- α 的蛋白翻译效率。

[0054] 此外, TNF- α 在内质网上合成后转运至高尔基体, 随即分选入不同的运输小泡内, 进而转运至细胞膜上。运输至膜上的 TNF- α 是一个前体蛋白 (Pro-TNF- α), 需要在细胞膜上由 TNF- α 转化酶 (TACE) 进行剪切, 才能将具有功能的 TNF- α 释放至胞外。于是, 我们考察柚皮素是否对 TACE 的酶活具有抑制作用。体外酶活实验表明, 柚皮素处理细胞多达 24 小时也不会对 TACE 酶的活性产生任何影响 (图 12)。因此, 综合以上结果, 柚皮素抑制了 TNF- α 从高尔基体向细胞膜的转运过程。

[0055] 进一步使用流式细胞术在巨噬细胞上分别考察了细胞内和细胞膜上的 TNF- α 水平, 发现柚皮素并不影响细胞内的 TNF- α 水平, 但显著减少细胞膜上的 TNF- α 水平。同样, 在 T 细胞上, 也观察到柚皮素可以增加细胞内 TNF- α 的水平, 但显著减少分泌到细胞外的 TNF- α 的水平。这一系列结果证明柚皮素选择性的阻断了 TNF- α 的分泌, 特别是由高尔基体向细胞膜的转运过程。

[0056] 实施例 5. 柚皮素对于博来霉素引起肺纤维化模型的治疗效果

[0057] 博来霉素, 日本化药株式会社产品; 胶原检测试剂盒购自 Biocolor 公司; 柚皮素, 购自陕西惠科有限公司, 纯度 > 98%, 本研究体外、体内所用样品均为同批次产品; 其余试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司或国产分析纯。

[0058] 博来霉素引起的大鼠肺纤维化模型: 将大鼠 (雌雄各半) 随机分为 4 组, 模型组、柚皮素给药组 (2006mg/kg)、阳性药组 (醋酸泼尼松 6mg/kg), 将大鼠麻醉后仰卧固定, 颈部消毒后逐层分离并暴露气管, 经气管软骨环间隙朝向心端刺入气管, 迅速注入 0.2ml 含博来霉素的生理盐水 (5mg/kg); 空白对照组行假手术, 气管内注入 0.2ml 生理盐水。造模后给药组灌胃给予 200mg/kg 的柚皮素, 阳性对照药组灌胃给予 6mg/kg 的醋酸泼尼松, 模型组灌胃等体积生理盐水, 均每天给药一次。造模后第 28 天处死动物, 分离肺组织, 称重后将左半肺置于 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片, 用于进行组织病理学检查和免疫组化分析。

[0059] H&E 染色表明, 博来霉素造模的大鼠肺组织有大量细胞外基质沉积, 肺泡壁增厚、倒塌, 肺脏结构紊乱, 柚皮素 ig200mg/kg 治疗的大鼠肺组织与阳性给药组醋酸泼尼松治疗的大鼠比较肺泡壁增厚较少, 肺脏结构基本完整, Ashcroft 计分分别为 0.91 和 0.69 (图 13)。

[0060] 实施例 6. 柚皮素对于纤维化伴生转移型恶性肿瘤的治疗效果

[0061] 采用博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型建立肺纤维化的 C57BL/6 雌性小鼠及 Balb/c 雌性小鼠, 同时与其肺纤维模型小鼠平行设 C57BL/6 和 Balb/c 用生理盐水滴鼻的正常小鼠对照, 即每种小鼠分配均如下: ①正常对照 (Normal): 鼻内滴生理盐水, 灌胃给 0.5% 的 CMC-Na; ②模型对照 (Control): 鼻内滴博来霉素, 灌胃给 0.5% 的 CMC-Na; ③柚皮素治疗组 (Nar 给药剂量: 100mg/kg): 鼻内滴博来霉素, 灌胃给 0.5% CMC-Na 混悬的柚皮素 100mg/kg 体重。博来霉素滴鼻后第 7 天, 将体外培养的小鼠乳腺癌 4T1 细胞以 1×10^5 / 每

鼠的剂量静脉注射接种于 C57BL/6 小鼠及 Balb/c 小鼠, 同日治疗组灌胃给予柚皮素, 未治疗组灌胃给予等容量溶剂 (0.1ml/10g 体重), 每日 1 次, 连续 4 周。肿瘤接种后第 28 天处死全部 C57BL/6 小鼠及 Balb/c 小鼠, 剥离肺脏, 称重, 计数肺部肉眼可见的肿瘤结节数, 比较肿瘤肺转移发生率及转移肿瘤大小。Balb/c 小鼠每组另外 10 只用于生存期考察, 记录接种肿瘤后 70 天内死于肺转移的小鼠数目, 分析比较小鼠存活。

[0062] 发生肺纤维化的 C57BL/6 和 Balb/c 小鼠接种肿瘤后 28 天的荷瘤肺重是 0.529g 和 0.584g, 而未发生是肺纤维化的对照小鼠荷瘤肺重仅有 0.261g 和 0.254g; 肺纤维化 C57BL/6 和 Balb/c 小鼠并加以柚皮素灌胃 100mg/kg 治疗组的荷瘤肺重是 0.286g 和 0.263g, 相比肺纤维化未治疗组小鼠荷瘤肺重分别减少 45.89% 和 54.95%。

[0063] 柚皮素治疗可以显著延长肺纤维化合并肿瘤肺转移小鼠的生存期。在 Balb/c 小鼠肿瘤被动肺转移模型中, 肺纤维化伴随肺转移小鼠中位存活为 39 天, 而未肺纤维化的肺转移小鼠中位存活为 63 天, 缩短 38.1%。柚皮素灌胃 100mg/kg 治疗后肺纤维化伴随肺转移小鼠中位存活为 56 天, 比未治疗组小鼠中位存活延长 43.6%。

[0064] 实施例 7. 柚皮素等对放射引起大鼠肺损伤及肺纤维化的治疗效果

[0065] Wistar 大鼠 (体重 200-220g, 雌雄各半) 随机分成 5 组: 空白组、模型组、柚皮素给药低剂量组、高剂量组和阳性对照组, 每组 10 个动物。肌肉注射 1.0ml/kg 速眠新麻醉后仰卧固定, 用 X 光机透视定位右侧肺位置, 标记出约 1.5×2.5cm 的区域为照射区, 其余部位用 20cm 铅砖屏蔽, 模型组、柚皮素和阳性药给药组用医用电子直线加速器进行深度 1cm 的照射, 剂量为 6Gy/次, 每天 1 次连续 5 天照射, 总照射剂量 30Gy; 或一次给予 12Gy 的照射。空白组进行假照射。于照射之日前 3 天起灌胃给予柚皮素, 剂量分别为 200/400mg/kg (低剂量组)、和 400mg/kg (高剂量组), 阳性对照药组灌胃给予 0.5mg/kg 的地塞米松), 空白组和模型组灌胃等体积生理盐水, 均每天给药一次, 共 60 天。在受照后 180 天放血处死动物, 血液用 EDTA 抗凝分离出血浆, -80℃ 保存用于 TGF-β1 测定。取大鼠右侧肺称重后, 中叶用 4% 甲醛固定后用于组织病理检测和免疫组织化学检测 (图 14)。从体重和病理切片来看, 200mg/kg 柚皮素给药组效果最好, 明显减轻了照射引起的肺纤维化进程。400mg/kg 组与模型对照相比有一定的改善。阳性对照组于模型对照组相比无改善, 但体重明显下降。

[0066] 实施例 8. 柚皮素、橙皮素、木犀草素及芹菜素对于转移瘤的抑制效果

[0067] Balb/c 小鼠 (体重 18-20g, 雌鼠) 分成 5 组: 模型组、柚皮素给药组、橙皮素给药组、木犀草素给药组及芹菜素给药组。尾静脉接种小鼠乳腺癌细胞 4T1 (2 万 / 只), 之后每天灌胃给药, 剂量为 200mg/kg, 模型对照灌胃给溶剂对照, 每天给药一次, 共 30 天, 处死动物, 称量肺重及数肺结节数。结果显示: 200mg/kg 柚皮素、木犀草素及芹菜素给药组均明显减少小鼠乳腺癌 4T1 细胞向肺部的转移 (图 15)。

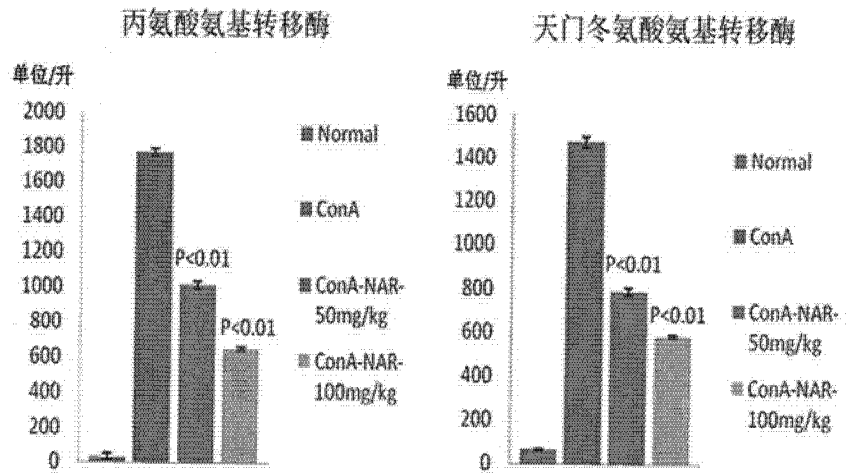


图 1

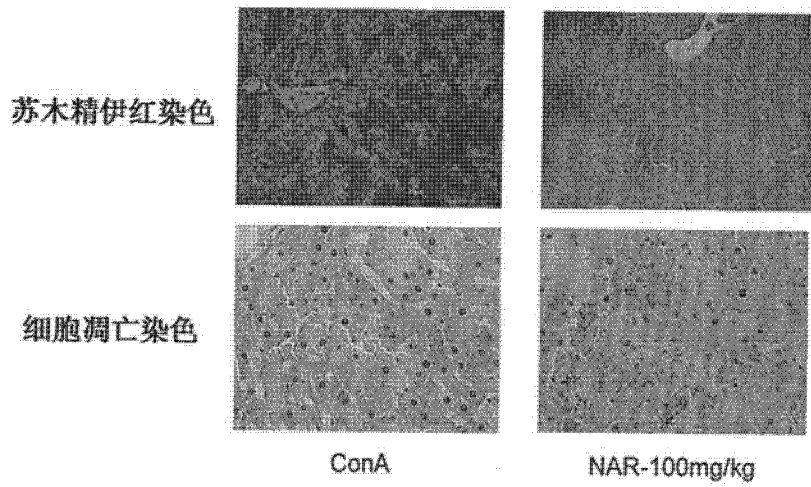


图 2

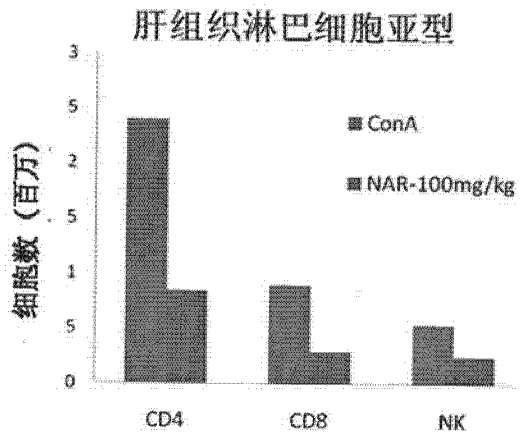


图 3

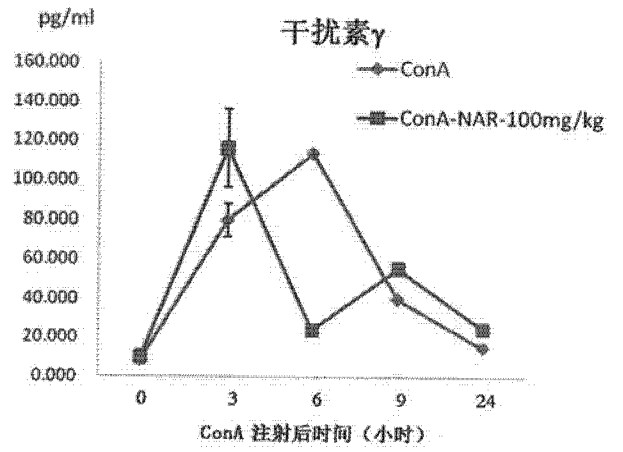


图 4

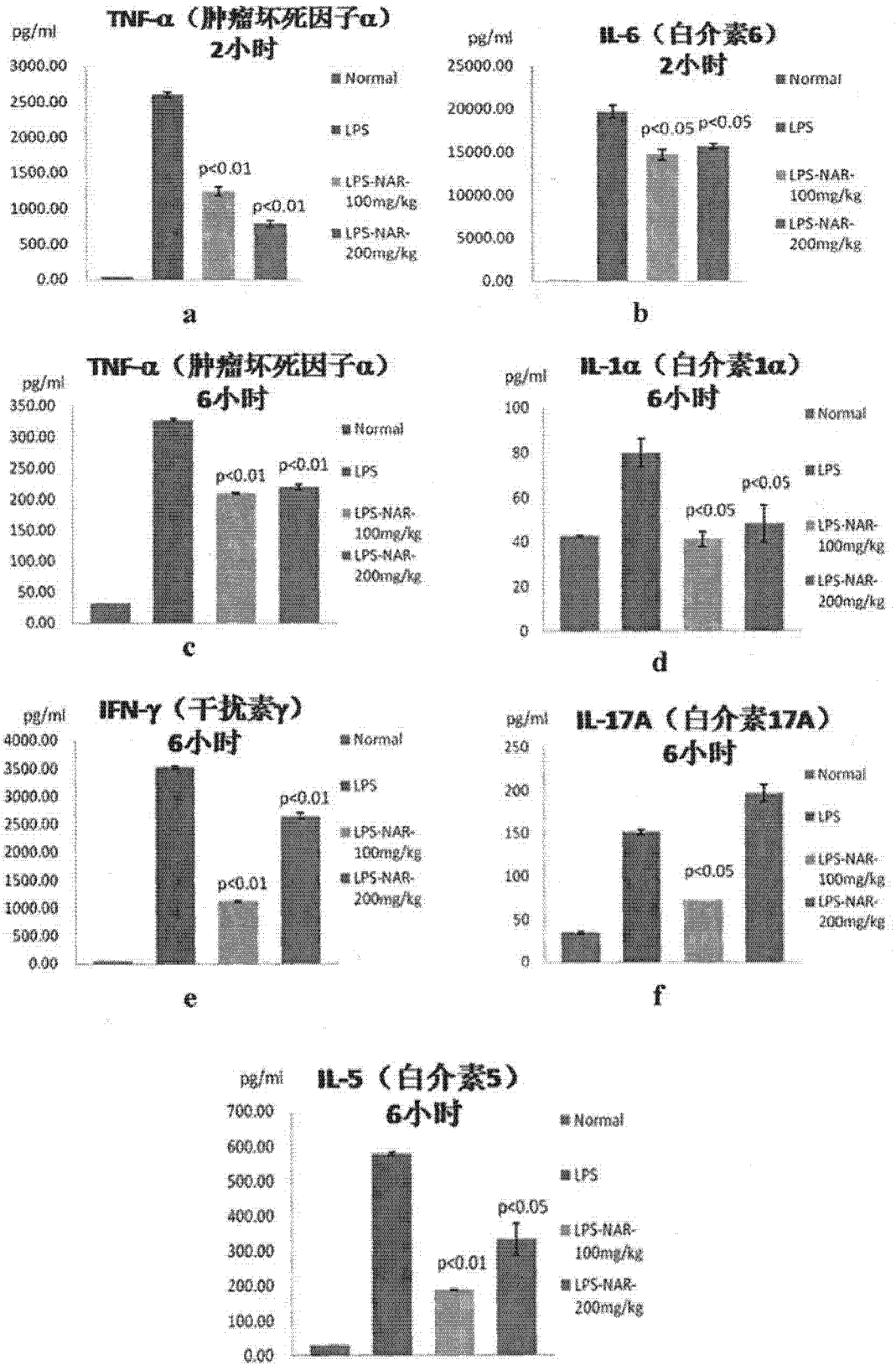


图 5

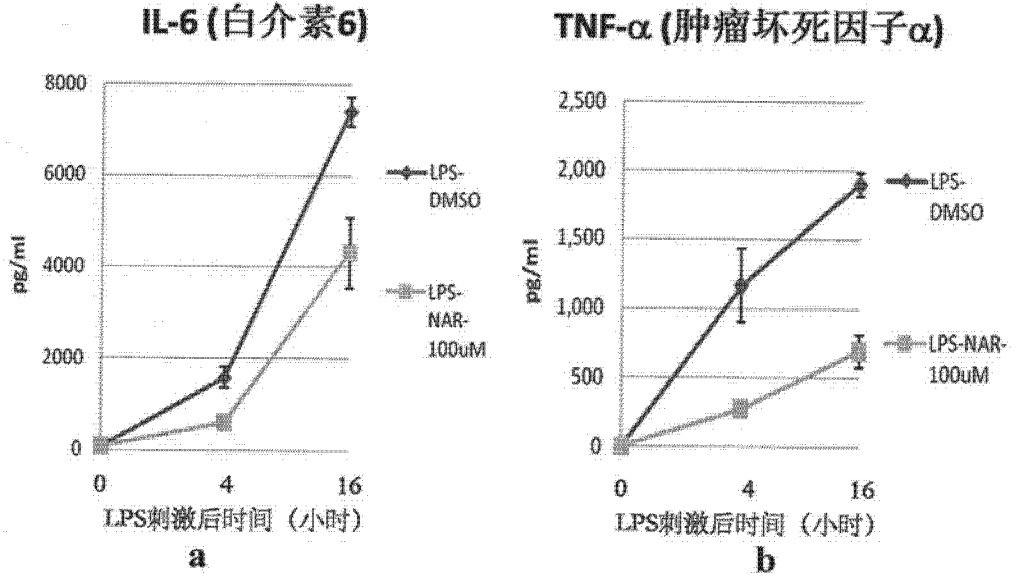


图 6

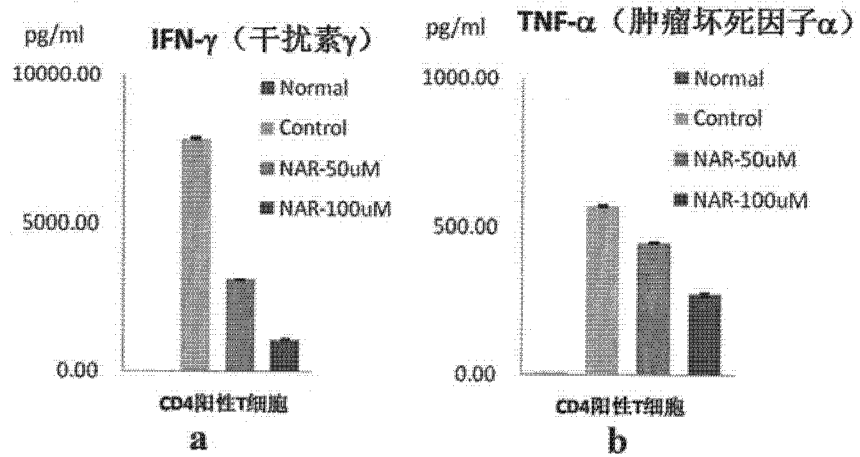


图 7

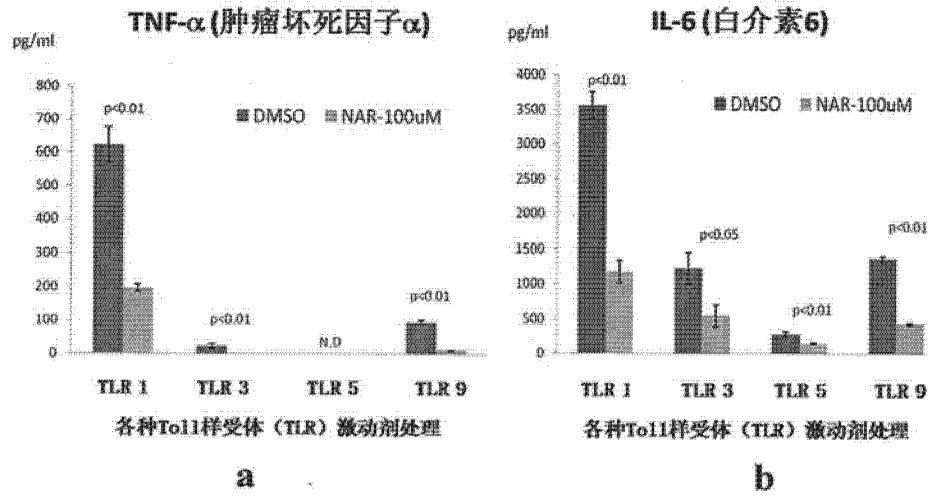
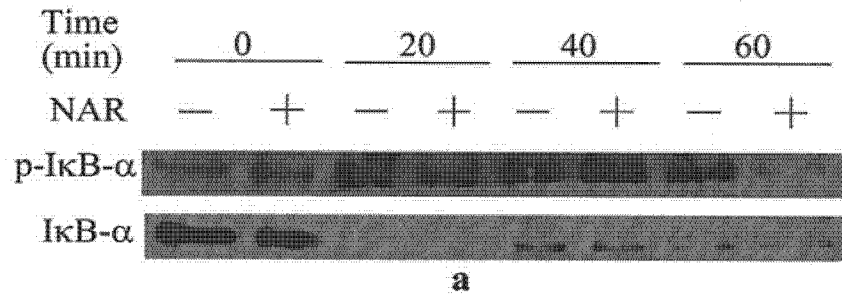
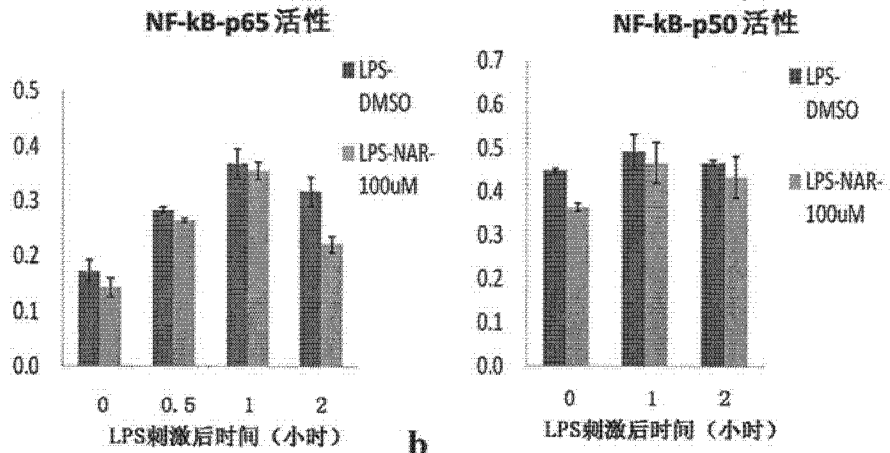


图 8



a



b

图 9

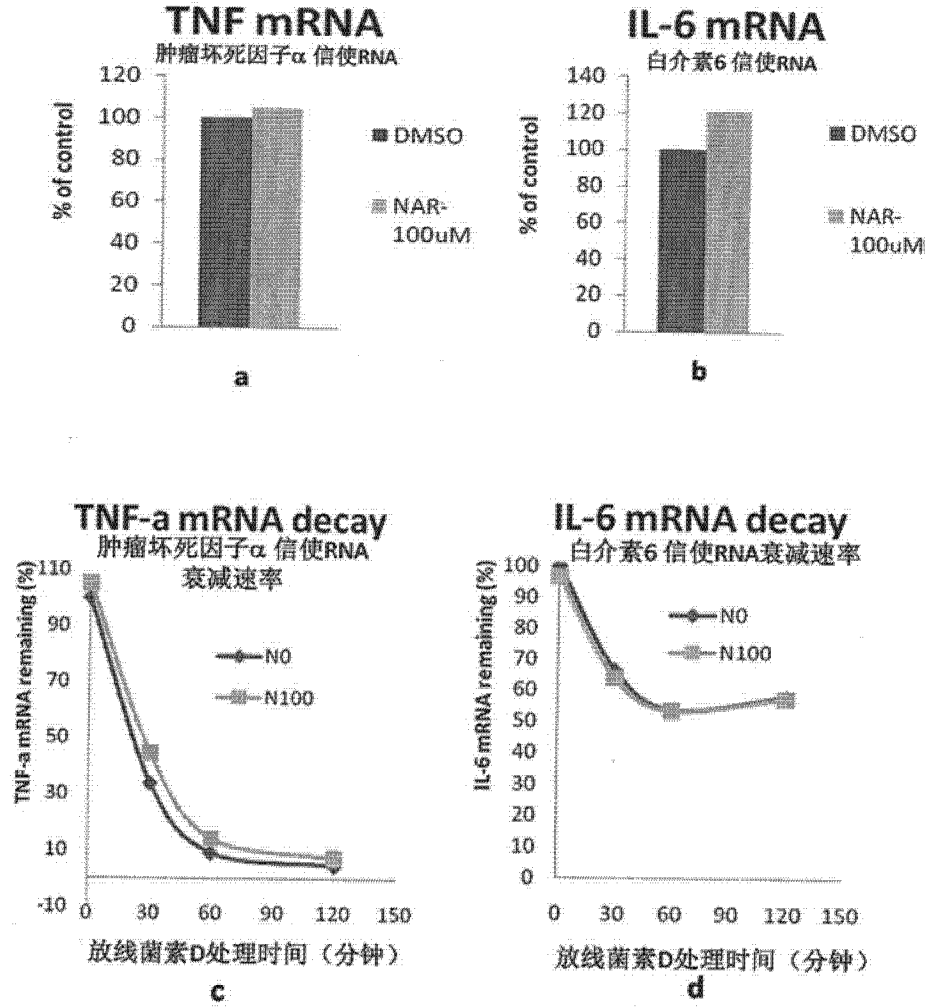


图 10

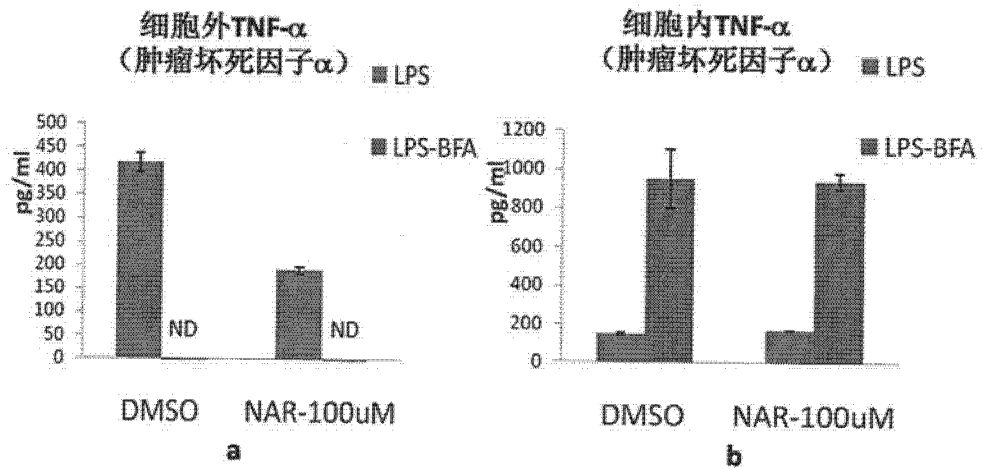


图 11

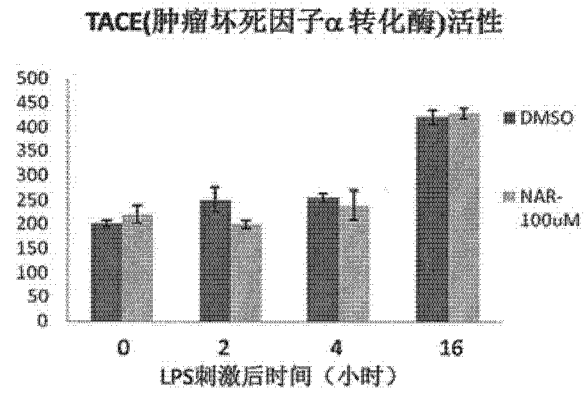


图 12

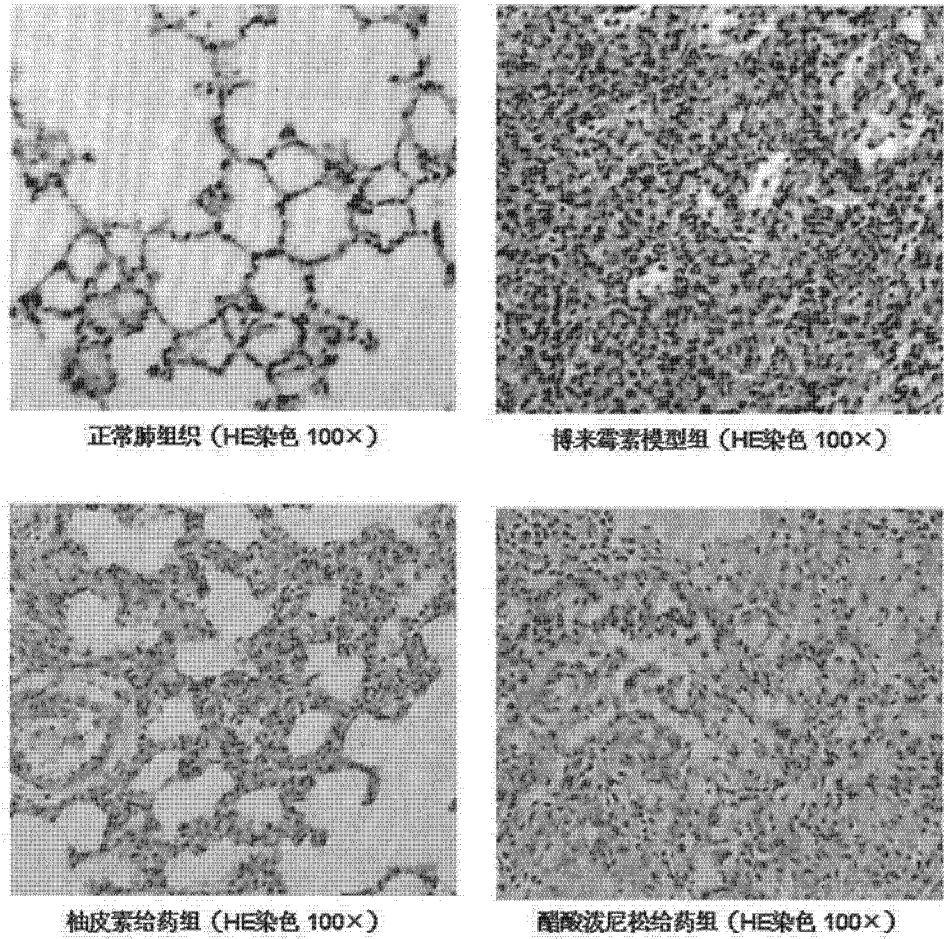


图 13

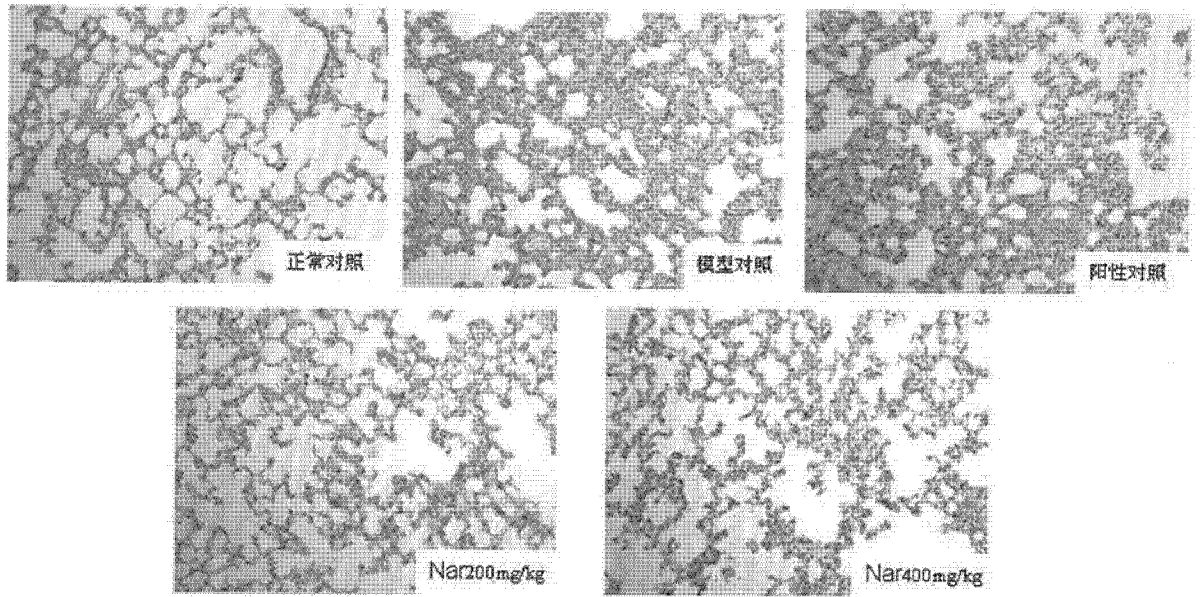


图 14

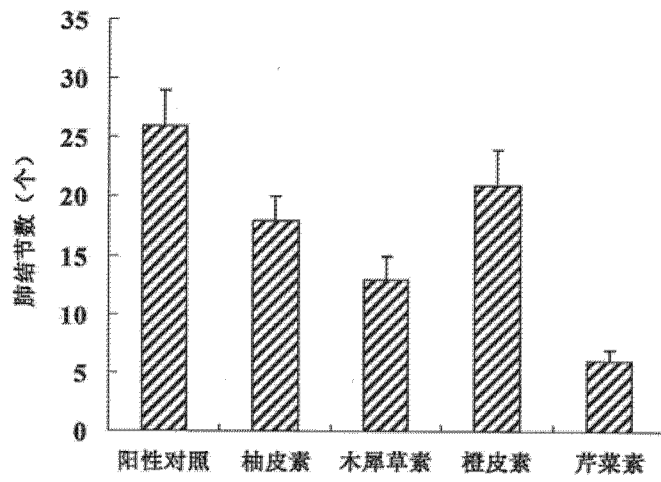


图 15