

[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 200710118871.3

[51] Int. Cl.

*A61K 31/352 (2006.01)*  
*A61K 31/7048 (2006.01)*  
*A61P 35/00 (2006.01)*  
*A61P 1/16 (2006.01)*  
*A61P 11/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年12月17日

[11] 公开号 CN 101322700A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200710118871.3

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

共同申请人 河南天方药业股份有限公司

[72] 发明人 梁伟 杜钢军 张鸿雁 金陵涛  
吕和平 王伟 刘金平 樊振

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司  
代理人 吴小明

权利要求书2页 说明书10页 附图6页

[54] 发明名称

柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂的应用

[57] 摘要

本发明公开了柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1信号通路的抑制剂的应用,特别是用于治疗或预防纤维化及肿瘤。

1. 柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂的应用。
2. 权利要求1的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防纤维化的药物中的应用。
3. 权利要求1的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用。
4. 根据权利要求2的应用，其中所述纤维化包括各组织器官的纤维化，优选为肝纤维化和肺纤维化。
5. 根据权利要求3的应用，其中所述肿瘤包括各种实体瘤、非实体瘤和转移性肿瘤，优选为肝癌和肺癌。
6. 根据权利要求1、2和4任一项的应用，其中所述柚皮素和柚皮苷用于治疗或预防纤维化伴随肿瘤疾病的动物有效剂量范围是：口服10-300mg/kg体重/日、皮下注射4-200mg/kg体重/日、静注1-30mg/kg体重/日，优选剂量为口服50-200mg/kg体重/日、皮下注射10-100mg/kg体重/日、静注5-20mg/kg体重/日；推算的人用有效剂量范围为口服0.8-24mg/kg体重/日、皮下注射0.2-6mg/kg体重/日、静注0.8-4mg/kg体重/日，优选剂量为口服4-12mg/kg体重/日；皮下注射0.6-2mg/kg体重/日；静注0.1-0.4mg/kg体重/日。
7. 根据权利要求1、3和5任一项的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂用于治疗或预防肿瘤的动物有效剂量范围是：口服10-300mg/kg体重/日、皮下注射4-200mg/kg体重/日、静注1-30mg/kg体重/日，优选剂量为口服50-200mg/kg体重/日、皮下注射10-100mg/kg体重/日、静注5-20mg/kg体重/日；推算的人用有效剂量范围为口服0.8-24mg/kg体重/

---

日、皮下注射0.2-6mg/kg体重/日、静注0.8-4mg/kg体重/日，优选剂量为口服4-12mg/kg体重/日；皮下注射0.6-2mg/kg体重/日；静注0.1-0.4mg/kg体重/日。

## 柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂的应用

### 技术领域

本发明涉及柚皮素 (naringenin) 和柚皮苷 (naringin) 的应用, 特别是作为转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor beta1, 简称 TGF- $\beta$ 1)信号通路的抑制剂在制药领域中的应用。

### 背景技术

纤维化是各种慢性疾病共同的病理基础和组织器官硬化乃至肿瘤发生的重要中间环节, 它主要是指各种致病因素刺激组织脏器细胞坏死, 组织内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常增多和过度沉积的病理过程, 其特点是大量纤维组织增生和沉淀, 胶原含量增加4~7倍[Won-Il Jeong et al., *Hepatology*, 44(6):1441-1451,(2006)]。在组织器官纤维化过程中, 成纤维细胞是区域纤维化多种表象的基础, 激活的成纤维细胞具有很强的产生和重组胶原能力, 组织损伤或炎症发生中一些细胞因子, 如细胞粘附分子1、血管内皮生长因子、结缔组织生长因子等调控着成纤维细胞的激活[Jurgen J. W. et al, *Annals of Surgery*, 242(6):880-887,(2005)]。诸多研究表明, TGF- $\beta$ 在纤维化过程、尤其是病理性纤维化过程中起关键作用, 它不仅直接激活静态的成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 还能诱导PDGF的产生及其受体在成纤维细胞上表达, 间接刺激成纤维细胞的增殖和活化, 促进成纤维细胞合成胶原、纤维连接蛋白及蛋白多糖等细胞外基质, 使ECM合成增加[Victorino R. Briones et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 345(2):595-601, (2006)]。另外, TGF- $\beta$ 也能通过下调MMPs表达令ECM不能正常降解, 同时还上调PAI和TIMPs的表达抑制ECM降解, 加速ECM的积聚, 最终导致纤维化的发生。因此, 抑制TGF- $\beta$ 有可能阻止和治疗纤维化疾病[Christelle Guyot et al, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 135-151,(2006)]。

TGF- $\beta$ 不仅是纤维化形成的关键调节者, 也是细胞生长、分化和迁移

的很强调节者,对肿瘤的发生、发展及转移也起重要作用,临床已经证明,TGF- $\beta$ 1过表达至少与人类乳腺癌、直肠癌、食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌的肿瘤发病有关,尤其是TGF- $\beta$ 1过表达与肿瘤进展、转移、新生血管形成及过差的预后有关[Brian Bierie et al, Cytokine & Growth Factor Reviews,17:29-40, (2006)]。TGF- $\beta$ 在肿瘤发生的起始对肿瘤生长有一定抑制作用,但随后便转为促进肿瘤发展,这主要表现在3个方面:①使细胞丧失生长抑制控制;②使肿瘤细胞获得转移性;③使肿瘤细胞逃逸免疫监视。其中使肿瘤细胞逃逸免疫监视的主要机理是TGF- $\beta$ 1在CD4<sup>+</sup>T 细胞的初始和记忆阶段以不同方式抑制其产生干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )。所以,抑制TGF- $\beta$ 也有可能阻止和治疗肿瘤疾病[Brian Bierie et al, Nature Reviews/Cancer, 6 :506-520, (2006)]。

近年来,癌相关成纤维细胞概念的提出使人们注意到纤维化疾病也与肿瘤的发生相关[Akira Orimo et al, Cell Cycle, 5(15): 1597-1601,(2006)],本发明的发明人在研究中发现纤维化为肿瘤提供了有利于其发展的微环境,TGF- $\beta$ 信号通路在这一过程中起到重要的作用。

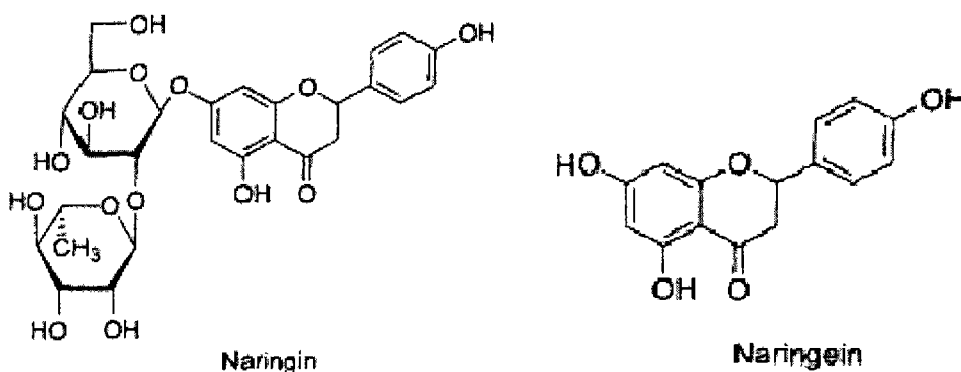
目前以TGF- $\beta$ 信号通路为靶点的治疗包括改变后的免疫成分、小分子抑制剂、可溶性蛋白和反义复合物抑制剂,但尚无一个干预TGF- $\beta$ 信号通路的药物上市,临床上对纤维化的治疗除传统的重组INF- $\gamma$ 外也无较理想的药物[Eiji Suzuki et al, Cancer Res, 67(5): 2351-2359(2007)]。

黄酮类化合物是中药中普遍存在的有效成分,具有抗菌、消炎、清除自由基、抗肿瘤等多种药理作用[Mouming Zhao et al, International Immunopharmacology , 7: 162-166,(2007)]。

柚皮苷(naringin)又称柚甙、柑橘甙、异橙皮甙,分子式C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>,分子量580.53,主要存在与芸香科植物葡萄柚、橘、橙的果皮和果肉中,也是中草药骨碎补、枳实、枳壳、橘红的主要有效成分。有报道表明大鼠皮下注射100mg/kg柚皮苷有明显的抗炎作用,200mg/L浓度的柚皮苷对水疱性口炎病毒有很强的抑制作用。柚皮苷还可降低血液的粘滞度、减少血栓的形成,并且有镇痛、镇静以及较强的增加实验动物胆汁分泌的作用。柚皮苷还有脱敏和抗过敏、活血解痉、改善局部微循环和营养供给的性能,对促进药物排泄、解除链霉素对第8对脑神经的损害、缓解链霉素的毒副

作用有独特疗效[Bok, S. H et al, *Nutr. Res.* 20, 1007–1015(2000)]。

柚皮素 (naringenin) 是柚皮苷的甙元，也是柚皮苷产生药理作用的结构部分，分子式  $C_{15}H_{12}O_5$ ，272.25，也具有抗菌、抗炎、痉和利胆等作用 [Chul-Ho Lee et al, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 681–688 (2001)]。柚皮素和柚皮苷的结构如下：



## 发明内容

本发明发明人首次发现在柠檬、葡萄汁、橘子等中普遍存在的天然黄酮类小分子化合物柚皮素及柚皮苷可以抑制 TGF- $\beta$  信号通路，从而升高血清 INF- $\gamma$ ，体内、体外实验均证明其具有治疗或预防纤维化及肿瘤作用，进而对其潜在的临床应用进行了深入的研究。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂的应用。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防纤维化的药物中的应用。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防纤维化的药物中的应用，其中所述纤维化包括各组织器官的纤维化，优选为肝纤维化和肺纤维化。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1 信号通路抑制剂在

制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用，其中所述肿瘤包括各种实体瘤、非实体瘤和转移性肿瘤，优选为肝癌和肺癌。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防纤维化的药物中的应用，其中所述柚皮素和柚皮苷用于治疗或预防纤维化伴随肿瘤疾病的动物有效剂量范围是：口服10-300mg/kg体重/日、皮下注射4-200mg/kg体重/日、静注1-30mg/kg体重/日，优选剂量为口服50-200mg/kg体重/日、皮下注射10-100mg/kg体重/日、静注5-20mg/kg体重/日。推算的人用有效剂量范围为口服0.8-24mg/kg体重/日、皮下注射0.2-6mg/kg体重/日、静注0.8-4mg/kg体重/日，优选剂量为口服4-12mg/kg体重/日；皮下注射0.6-2mg/kg体重/日；静注0.1-0.4mg/kg体重/日。

本发明涉及柚皮素和柚皮苷作为转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用，其中所述转化生长因子- $\beta$ 1信号通路抑制剂用于治疗或预防肿瘤的动物有效剂量范围是：口服10-300mg/kg体重/日、皮下注射4-200mg/kg体重/日、静注1-30mg/kg体重/日，优选剂量为口服50-200mg/kg体重/日、皮下注射10-100mg/kg体重/日、静注5-20mg/kg体重/日。推算的人用有效剂量范围为口服0.8-24mg/kg体重/日、皮下注射0.2-6mg/kg体重/日、静注0.8-4mg/kg体重/日，优选剂量为口服4-12mg/kg体重/日；皮下注射0.6-2mg/kg体重/日；静注0.1-0.4mg/kg体重/日。

本发明揭示柚皮素和柚皮苷作为TGF- $\beta$ 1信号通路的抑制剂可以用于治疗或预防纤维化及肿瘤。柚皮素抑制大鼠肝星形细胞增殖及其细胞基质和胶原蛋白分泌（见图1和图2）。柚皮素对大鼠肝星形细胞增殖有明显抑制作用，且显著抑制纤溶酶原激活抑制剂1(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)和胶原1 $\alpha$  (Col 1 $\alpha$ 1) 的表达。上述结果表明柚皮素具有潜在的抗纤维化作用。

柚皮素对四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 所致小鼠肝损伤（纤维化）具有保护作用。肝脏大小直接反应肝脏的受损肿胀程度，柚皮素高、中剂量对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠肝脏增大有明显抑制作用 (p<0.01, 见图3)。

MDA (malondialdehyde, 丙二醛) 是机体脂质过氧化损伤后的产物，

其含量越高表示机体受损程度越重，柚皮素高、中、低剂量对  $\text{CCl}_4$  致肝纤维化小鼠血清 MDA 均有明显降低作用 ( $p < 0.05$ ，见图 4)；CAT (catalase, 过氧化氢酶)、POD(oxidase, 过氧化物酶)有清除机体  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、减少自身损害的作用，体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度升高是刺激 CAT 与 POD 活性增加的主要因素，柚皮素高、中、低剂量对  $\text{CCl}_4$  致肝纤维化小鼠血清 CAT 及 POD 应激性升高均有降低作用 ( $p < 0.05$ ，见图 4)，数据表明柚皮素有减少体内自由基作用。

ALT (Alanine aminotransferase, 丙氨酸氨基转移酶)、AST(Aspartate aminotransferase, 天冬氨酸氨基转移酶)活性直接反映肝脏受损程度，其活性越高代表肝脏损害越重，柚皮素高、中、低剂量对  $\text{CCl}_4$  致肝纤维化小鼠血清 ALT、AST 升高均有降低作用 ( $p < 0.01$ ，见图 5)。上述结果表明柚皮素对  $\text{CCl}_4$  所致的小鼠肝损伤 (纤维化) 有明显的保护作用。

另外，柚皮素口服 200、100、50mg/kg 体重/日或静注 20、10、5mg/kg 体重/日或皮下注射 40、20、10mg/kg 体重/日 3 个剂量治疗和等摩尔剂量的柚皮苷对小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤的生长均有显著地抑制作用 ( $P < 0.01$ ，见图 6、图 7 和图 8)。

三个剂量组的柚皮素均能减少 Lewis 肺癌的肺转移数 ( $P < 0.05$ ，见图 9)，减慢肺转移肿瘤的生长 ( $P < 0.01$ ，见图 10)，表明柚皮素有抗肿瘤转移作用。

柚皮素对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠血清 TGF- $\beta$ 1 有显著地抑制作用 ( $P < 0.01$ ，见图 11)，可以显著地升高血清中 INF- $\gamma$  水平 ( $P < 0.05$ ，见图 12)，表明柚皮素可通过抑制 TGF- $\beta$ 1、诱导 INF- $\gamma$  起到治疗纤维化和肿瘤疾病作用。同时，柚皮素降低了小鼠血清 MDA ( $P < 0.01$ ，见图 12)。

总之，结合上述发明内容，本发明的有益效果可以概括成以下五个方面：

- ①柚皮素和柚皮苷对四氯化碳所致小鼠肝纤维化有治疗或预防作用，可以减轻肝纤维化程度，调节肝功能水平趋于正常。
- ②柚皮素和柚皮苷对博来霉素所致的小鼠肺纤维化有治疗或预防作用，可以明显减轻肺纤维化程度，阻止肺损伤。
- ③柚皮素和柚皮苷对小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤有明显生长抑制作用，可



以减慢肿瘤生长速度，延长小鼠存活时间。

④柚皮素和柚皮苷对小鼠 Lewis 肺癌转移有明显抑制作用，可以减少 Lewis 肺癌转移发生率，阻止肺转移肿瘤生长速度。

⑤柚皮素和柚皮苷对纤维化引起的小鼠血清 TGF- $\beta$ 1 及 MDA 升高均有明显降低作用，可以将其调至正常水平，同时柚皮素对因 TGF- $\beta$ 1 升高所致小鼠血清 INF- $\gamma$  降低也有明显回升作用。

### 附图说明

图 1 是柚皮素对大鼠肝星形细胞增殖影响的曲线图。

图 2 是柚皮素对纤溶酶原激活抑制剂 1(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)和胶原 1 $\alpha$  (Col Ialpha1) 的细胞基质胶原蛋白分泌表达图。

图 3 是柚皮素对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠肝脏增大的影响的柱状图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 4 是柚皮素对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 MDA、CAT、POD 升高的影响的柱状图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 5 是柚皮素对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 ALT 及 AST 升高的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 6 是柚皮素对小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤生长的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 7 是柚皮素 (iv) 对小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤生长的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 8 是柚皮素 (sc) 对小鼠肝癌 H22 皮下肿瘤生长的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 9 是柚皮素对小鼠 Lewis 肺癌转移的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 10 是柚皮素对小鼠 Lewis 肺癌转移肿瘤生长的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 11 是柚皮素对博来霉素致肺纤维化小鼠血清 TGF- $\beta$ 1 升高的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

图 12 是柚皮素对博来霉素致小鼠血清 IFN- $\gamma$  降低及 MDA 升高的影响的曲线图，其中 Nar(ig)表示用柚皮素或柚皮苷灌胃、Nar(iv)表示用柚皮素或柚皮苷静脉注射 (iv)、和 Nar(sc)表示用柚皮素或柚皮苷皮下注射 (sc)。

### 具体实施方式

可以将本发明的柚皮素和柚皮苷作为 TGF- $\beta$ 1 信号通路的抑制剂用于治疗或预防纤维化及癌症。本发明对柚皮素和柚皮苷的抗纤维化及抗肿瘤活性进行了试验，柚皮苷在等摩尔剂量下作用与柚皮素相当，所以下面试验仅以柚皮素为例。本发明中的柚皮素和柚皮苷均购自陕西慧科植物开发有限公司。

#### 实施例1. 柚皮素对大鼠肝星形细胞增殖及细胞基质胶原蛋白分泌的影响

实验方法: 大鼠肝星形细胞(HSC-T6, Hepatic stellate cell,由美国 Mount Sinai 医学中心 Friedman 教授提供)培养于含 10%胎牛血清(美国 PPA 公司)、青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 RPMI1640 培养基中(Sigma 公司), 5%CO<sub>2</sub>、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。将丰度 90%的细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化后将细胞数调至  $5 \times 10^4$ /ml, 以 100  $\mu$ l/孔接种于 96 孔培养板, 细胞贴壁过夜后补充含不同浓度柚皮素的培养基 100  $\mu$ l/孔, 每个浓度 4-6 个复孔, 继续培养 48h 后, 除去培养基, 以 100 $\mu$ l/孔加含 0.5mg/ml MTT (dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- diphenyltetrazolium bromide, Sigma 公司)的磷酸盐缓冲液(PBS), 培养 4h 后除去 MTT, 加二甲基亚砷

DMSO(dimethyl sulfoxide)100 $\mu$ l/孔,在酶标仪 590 nm 测吸光度(MK3型,德国 Thermo 公司)。以对照孔(不含柚皮素)的吸光度为 100%,药物孔与对照孔间的吸光度比值为细胞存活百分率,做细胞存活曲线观察柚皮素对大鼠肝星形细胞增殖的影响。对于柚皮素对大鼠肝星形细胞基质胶原蛋白分泌的影响,将细胞以  $2\times 10^5$ /ml 接种于 6 孔板,每孔 3 复孔,药物处理方式均同 96 孔板。药物处理 48 h 后,将细胞用胰酶消化,用 PBS 洗 3 次后按 Western blotting 方法检测胶原 1 $\alpha$ (Col 1 $\alpha$ 1, collagen I $\alpha$ 1)、纤维连接蛋白(FN, fibronectin)和纤溶酶原激活抑制剂 1(PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1)。本实施例中人重组细胞因子 TGF- $\beta$ 1 购自美国 R&D 公司,标准蛋白及蛋白分子量标准购自美国 Bio-Rad 公司,所有抗体(包括基础抗体和第二抗体)均购自美国 Santa Cruz 生物技术公司。

结果:肝星形细胞的激活增殖是肝纤维化形成的基础,柚皮素对大鼠肝星形细胞增殖有明显抑制作用( $p<0.05$ ,见图1)。纤溶酶原激活抑制剂 1(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)和胶原 1 $\alpha$ (Col 1 $\alpha$ 1)均由激活的星状细胞分泌,是纤维化形成所需的基质胶原蛋白物质,柚皮素对 3 种基质胶原蛋白均有下调作用(见图2)。以上结果表明柚皮素有抗纤维化作用。

## 实施例2. 柚皮素对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)所致小鼠肝纤维化的影响

实验方法:雌性 balb/c 小鼠(北京维通利华实验动物公司提供)皮下注射 10% CCl<sub>4</sub>(carbon tetrachloride), 0.2ml/只,每周 2 次,连续 4 周造成肝纤维化模型。从第 2 周开始治疗组用柚皮素(Nar)高(100mg/kg)、中(50mg/kg)和低(25mg/kg)3 个剂量灌胃(ig),或静脉注射(iv) 5mg/kg 及皮下注射(sc) 20mg/kg 治疗,另设 1 组未造纤维化模型的小鼠为正常对照小鼠,每组 10 只小鼠,每日给药 1 次,连续 3 周。第 28 天眶静脉取血用于血液指标检测,然后,处死小鼠,剥离肝脏,称重。本实施例中 MDA、CAT 及 POD 试剂盒购自中国南京建成生物技术公司,ALT 和 AST 试剂盒购自中国北京中生北控生物技术公司。

结果:肝脏大小直接反应肝脏的受损肿胀程度,柚皮素 ig 高、中剂量对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠肝脏增大有明显抑制作用;柚皮素 iv 及 sc 给药也同样有效( $p<0.01$ ,见图3)。MDA(malondialdehyde,丙二醛)是机体脂质

过氧化损伤后的产物，其含量越高代表集体损伤越重，柚皮素高、中和低剂量对CCl<sub>4</sub>致肝纤维化小鼠血清MDA均有明显降低作用；柚皮素iv及sc给药也同样有效（ $p < 0.05$ ，见图4）；CAT（catalase, 过氧化氢酶）、POD(peroxidase, 过氧化物酶)有清除机体H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、减少自身损害的作用，体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度升高是刺激CAT与POD活性增加的主要因素，柚皮素高、中和低剂量对CCl<sub>4</sub>致肝纤维化小鼠血清CAT及POD应激性升高均有降低作用；柚皮素iv及sc给药也同样有效（ $p < 0.05$ ，见图4），间接证明柚皮素有减少体内自由基作用。ALT（Alanine aminotransferase, 丙氨酸氨基转移酶）、AST(Aspartate aminotransferase, 天冬氨酸氨基转移酶)活性直接反应肝脏受损程度，其活性越高代表肝脏损害越重，柚皮素高、中和低剂量对CCl<sub>4</sub>致肝纤维化小鼠血清ALT、AST升高均有降低作用；柚皮素iv及sc给药也同样有效（ $p < 0.01$ ，见图5）。上述结果表明，柚皮素对CCl<sub>4</sub>所致的小鼠肝纤维化有抑制作用。

### 实施例3. 柚皮素对小鼠肝癌H22皮下肿瘤生长的影响

实验方法：将小鼠肝癌H22皮下肿瘤（中国医学科学院药物研究所提供）用PBS制成细胞悬液后，调细胞数 $5 \times 10^6/\text{ml}$ ，以0.2ml/只接种于雌性balb/c小鼠前肢腋部皮下。肿瘤接种后次日开始治疗组用柚皮素（Nar）灌胃（ig）200mg/kg、100mg/kg和50mg/kg3个剂量或静脉注射（iv）20mg/kg、10mg/kg和5mg/kg3个剂量或皮下注射（sc）40mg/kg、20mg/kg和10mg/kg3个剂量治疗，每组10只小鼠，每日给药1次，连续2周。从肿瘤长出后，每隔2天用游标卡尺测量肿瘤体积，以长 $\times$ 宽 $\times$ 0.5宽表示肿瘤体积，绘制肿瘤生长曲线。

结果：柚皮素ig或iv高、中和低3个剂量及柚皮素sc高、中2个剂量对小鼠肝癌H22皮下肿瘤的生长均有抑制作用（ $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ，见图6、图7和图8），表明柚皮素有抗肿瘤作用。

### 实施例4. 柚皮素对Lewis肺癌转移的影响

实验方法：将小鼠Lewis肺癌皮下肿瘤（中国医学科学院药物研究所提供）用PBS制成细胞悬液后，将细胞数调至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，以0.2ml/只iv

接种于雌性 balb/c 小鼠。肿瘤接种后次日开始治疗组用柚皮素 (Nar) 高 (100mg/kg)、中(50mg/kg)和低(25mg/kg)3 个剂量灌胃 (ig), 或静脉注射 (iv) 5mg/kg 或皮下注射 (sc) 20mg/kg 治疗, 每组 10 只小鼠, 每日给药 1 次, 连续 3 周。肿瘤接种后第 22 天处死小鼠, 剥离肺脏, 称重, 计数肺部肉眼可见的肿瘤结节数。

结果: 柚皮素ig高中能减少Lewis肺癌的转移数 ( $P<0.05$ , 见图9), 减慢肺转移肿瘤的生长 ( $P<0.01$ , 见图10), 柚皮素iv或sc给药同样有效, 表明柚皮素有抗肿瘤转移作用。

#### 实施例5. 柚皮素对小鼠血清TGF- $\beta$ 1、INF- $\gamma$ 和MDA的影响

实验方法: 用戊巴比妥钠 30mg/kg(0.3%, 0.2ml/只)将雌性 balb/c 小鼠麻醉后, 以博来霉素 100ug/只 (日本化药株式会社产品, 2ug/ml, 50ul/只) 一次性滴鼻造肺纤维化模型。肿瘤接种后次日开始治疗组用柚皮素 (Nar) ig (50mg/kg) 或 iv (5mg/kg) 或 sc (20mg/kg) 治疗, 每组 10 只小鼠, 每日给药 1 次, 连续 3 周。造模后第 22 天采血分离血清用 ELISA 试剂盒检测 TGF- $\beta$ 1、INF- $\gamma$  及 MDA。本实施例中 TGF- $\beta$ 1 和 INF- $\gamma$  试剂盒由美国 Genzyme 公司提供。

结果: TGF- $\beta$ 1 (转化生长因子 $\beta$ 1) 是纤维化形成的主要细胞因子, 也是肿瘤发生、发展的促进因子; INF- $\gamma$  (干扰素 $\gamma$ ) 有与TGF- $\beta$ 1相反的作用, 可以减少纤维化、阻止肿瘤生长。柚皮素3种给药途径对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠血清TGF- $\beta$ 1升高均有明显抑制作用 ( $P<0.01$ , 见图11)、可以促进INF- $\gamma$ 分泌 ( $P<0.05$ , 见图12), 表明柚皮素可通过抑制TGF- $\beta$ 1、诱导INF- $\gamma$ 起到治疗纤维化和肿瘤疾病作用。柚皮素降低小鼠血清MDA ( $P<0.01$ , 见图12) 是柚皮素可以阻止机体损伤的又一佐证。

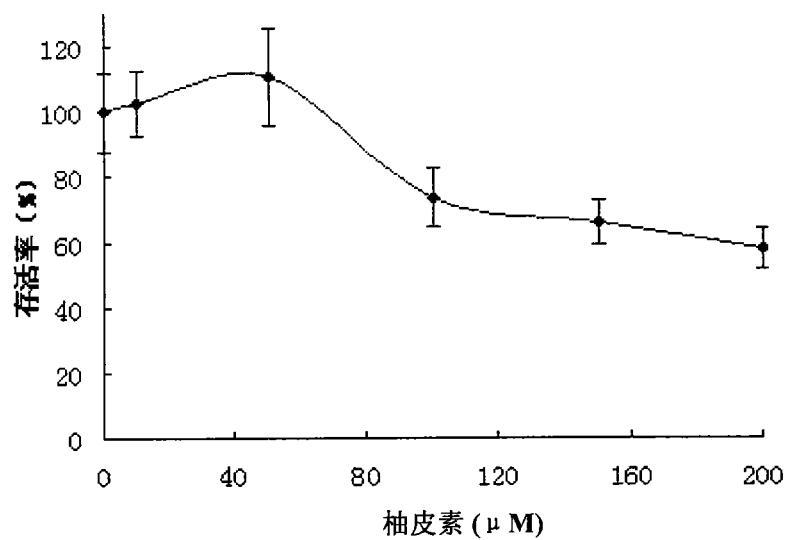


图1

TGF-β1 (10 ng/ml)	+	+	+	+	+	+
柚皮素 (μM)	0	1.0	5.0	10	20	50
泳道	1	2	3	4	5	6

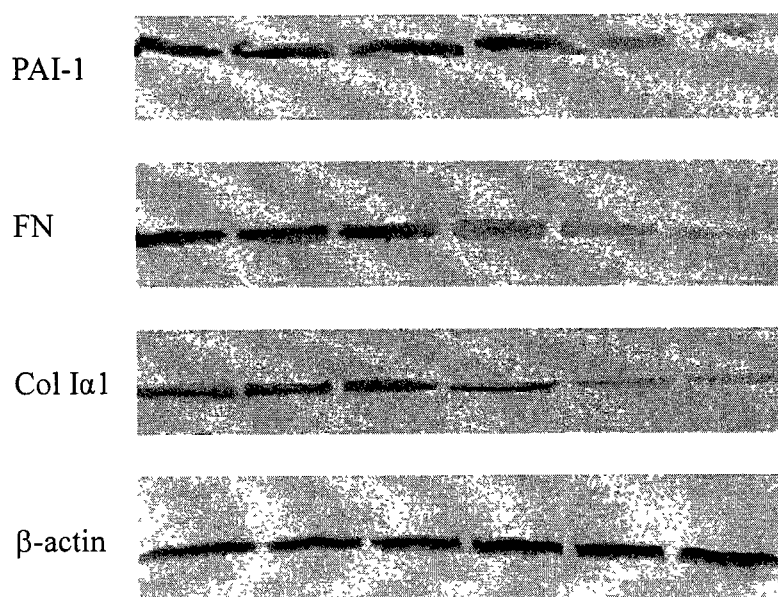


图2

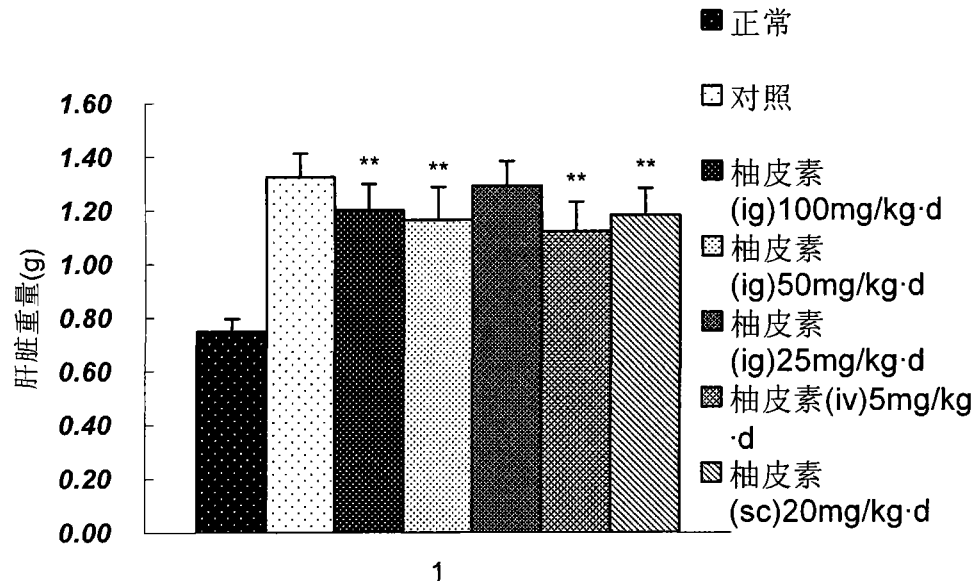


图3

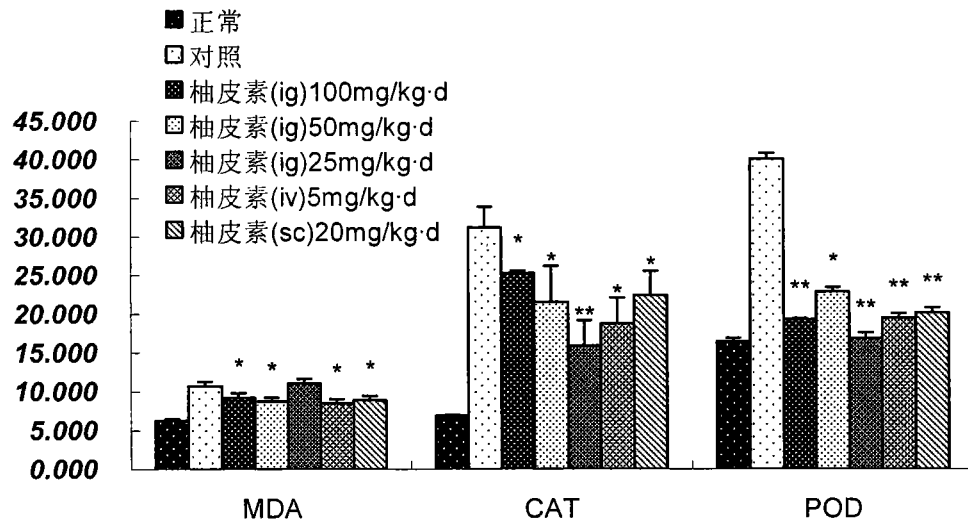


图4

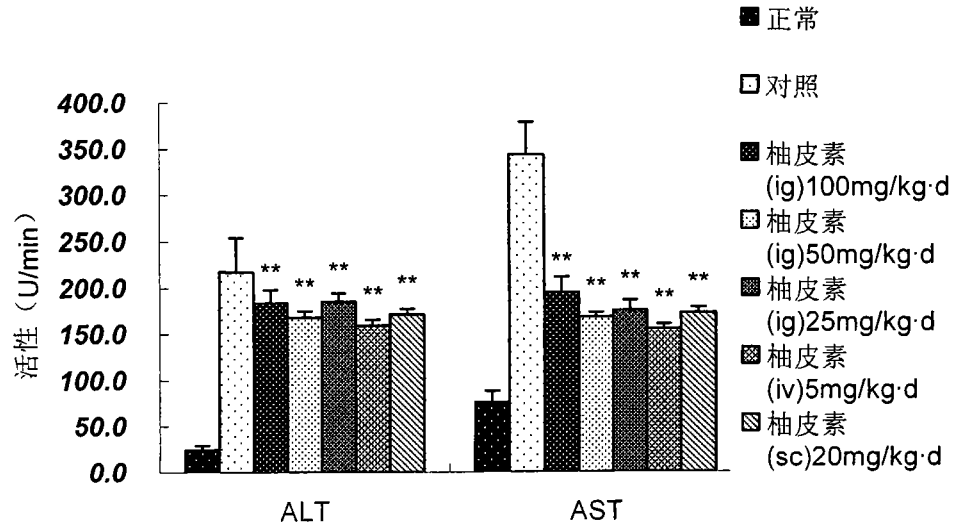


图5

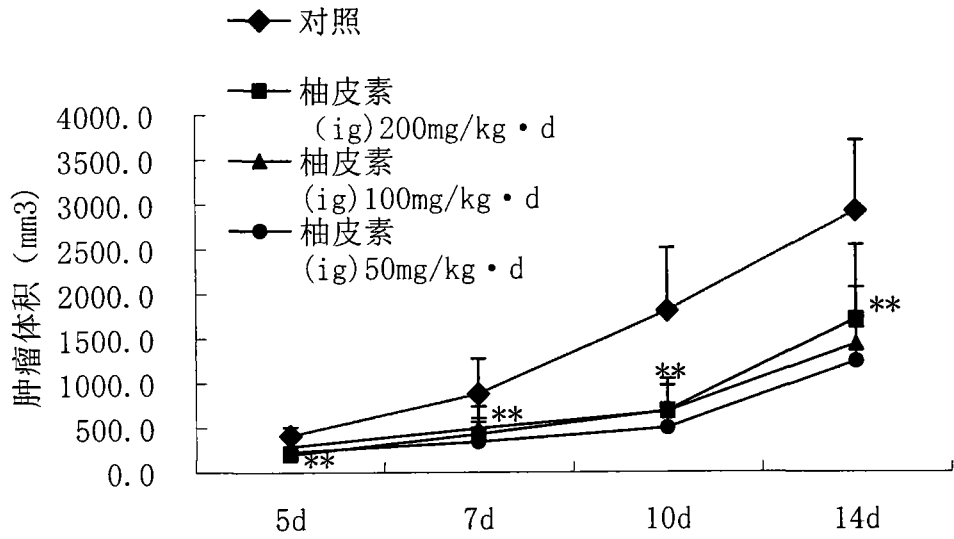


图6



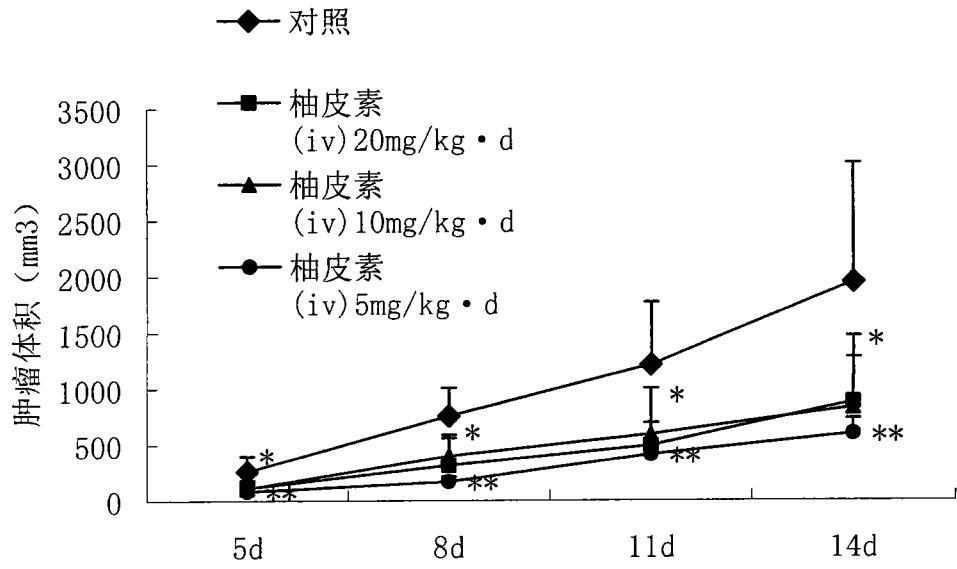


图7

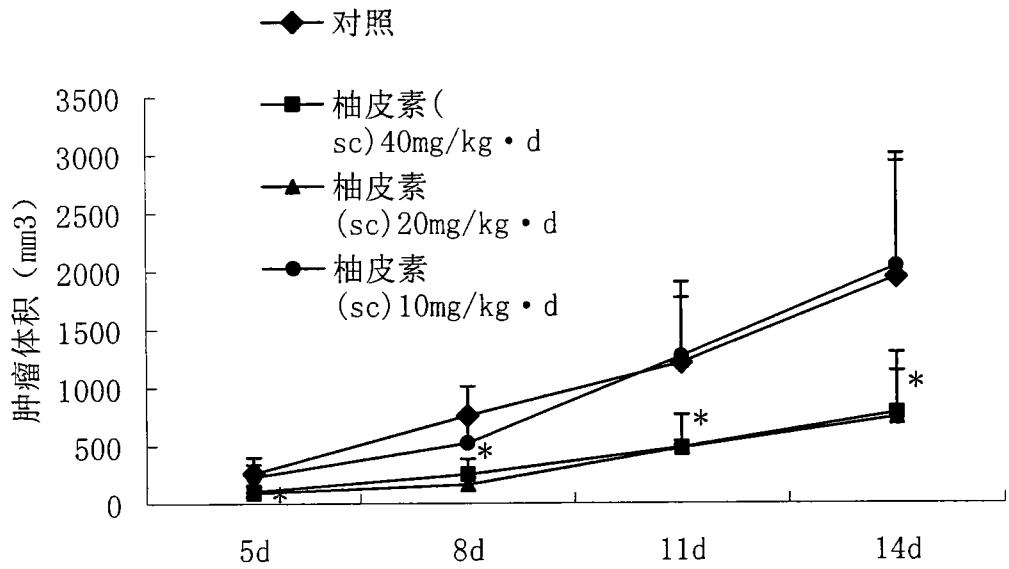


图8

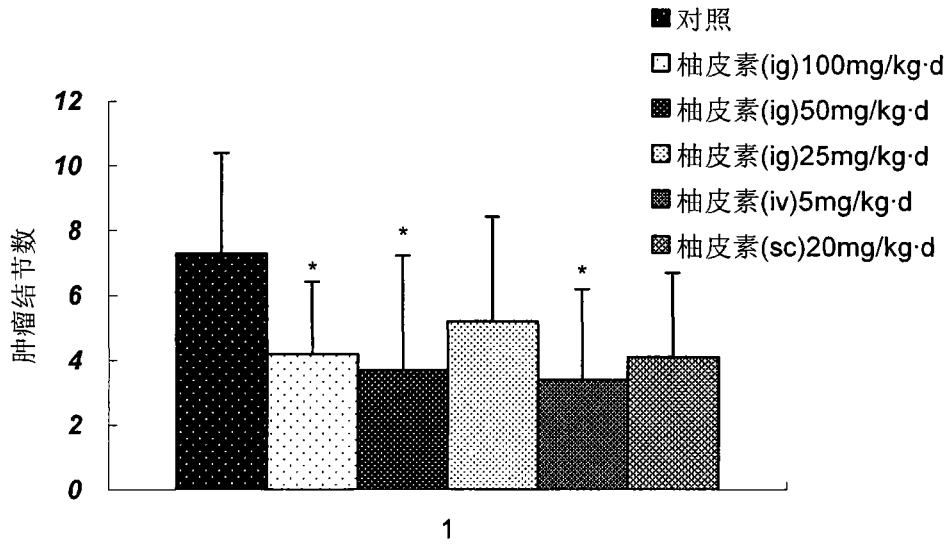


图9

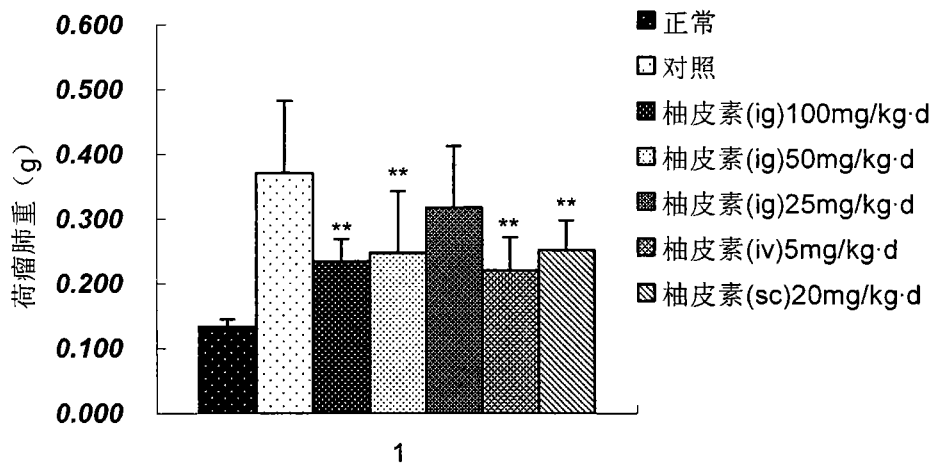
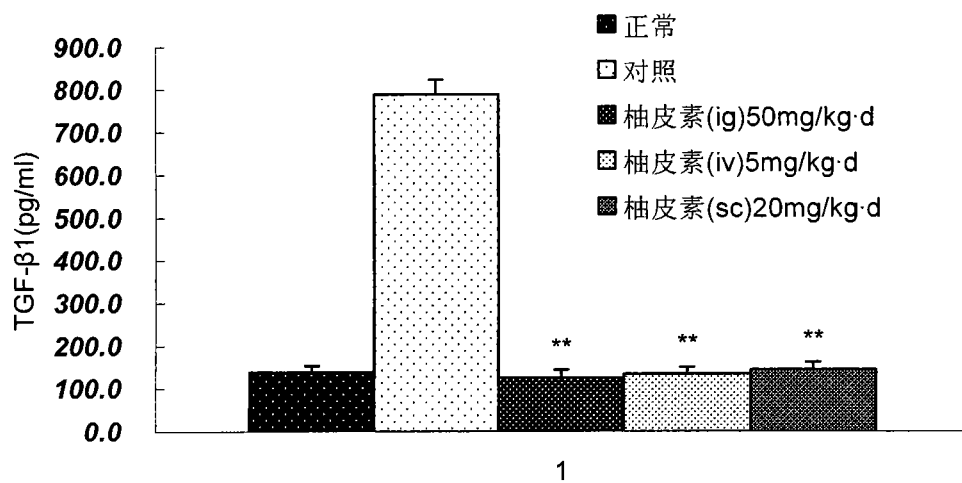


图10



1  
图11

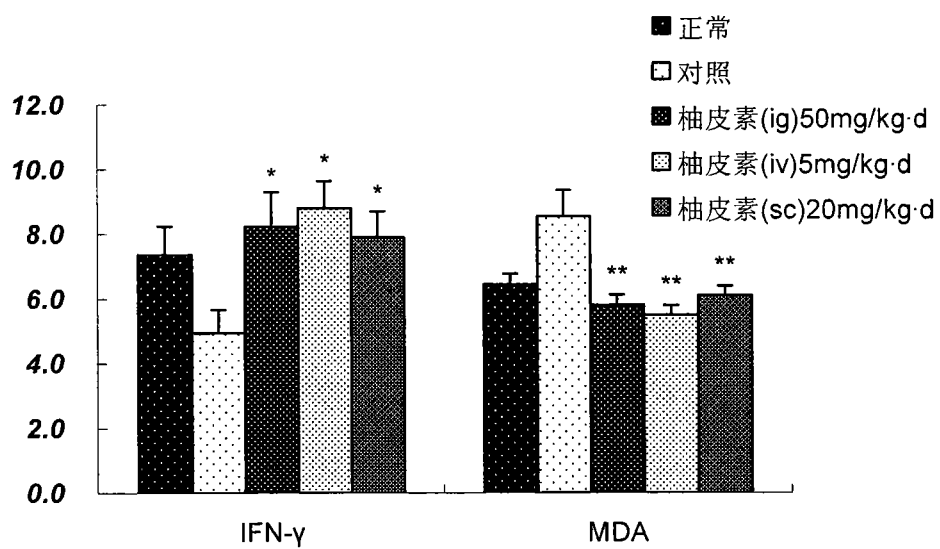


图12