



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104940932 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201510404716. 2

(22) 申请日 2015. 07. 10

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 梁伟 张春玲 曾文峰 张超

王洛洋

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所

11430

代理人 郎坚

(51) Int. Cl.

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 31/352(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 11/00(2006. 01)

A61K 51/00(2006. 01)

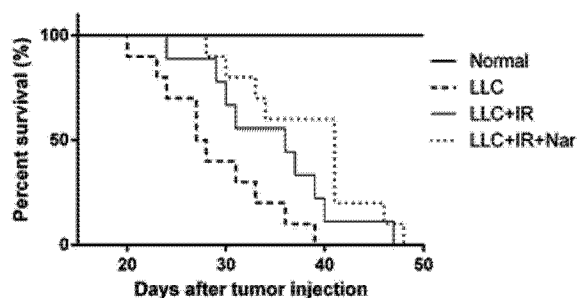
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

柚皮素和柚皮苷在肿瘤放射治疗中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种柚皮素和柚皮苷在肿瘤放射治疗中的应用,特别是制备肿瘤放射治疗增敏同时降低放射性损伤的制剂的应用,以及制备调控与免疫相关的细胞因子的释放的制剂的应用。并且,不同于传统的放疗保护剂,柚皮素和柚皮苷并不通过抗氧化对抗自由基进行放疗保护,而是在放疗保护的同时有很好的增效作用。



1. 黄酮类小分子化合物的如下应用：
  - (1) 制备对肿瘤放射性治疗增敏 / 增效的同时降低放射性损伤药物的应用。
  - (2) 制备调控与免疫相关的细胞因子的释放的制剂的应用。
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,优选为柚皮素或柚皮苷。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于,所述的对肿瘤放射性治疗为临床适用的放射性治疗方法,包括但不限于,
  - (1) 体外放射性治疗或体内放射性治疗;
  - (2) 立体定向放射治疗;
  - (3) 直接电离粒子型放疗或间接电离粒子型放疗;
  - (4) X 线治疗机放射疗法、医用加速器放射疗法、放射性核素放射疗法。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于,所述的肿瘤优选为胸部肿瘤,最优选为肺癌,食管癌,乳腺癌和纵膈肿瘤。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于,所述的细胞因子包括但不限于白介素 1b(IL-1b)、白介素 6(IL-6)、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于,所述的放射性损伤为由放射导致的组织炎症、组织纤维化。
7. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于,所述的放射性损伤优选为放射性肺损伤,包括治疗早期的放射性肺炎和治疗后期的放射性肺纤维化。
8. 一种以黄酮类小分子化合物为有效成分制备获得的对肿瘤放射性治疗增敏 / 增效的同时降低放射性损伤的药物组合物或药物制剂,其特征在于,所述的药物组合物或药物制剂包括黄酮类小分子化合物,常规药用辅料。
9. 根据权利要求 8 所述的药物组合物或药物制剂,其特征在于,  
所述的药用辅料包括赋型剂、崩解剂、支持剂、缓释剂等;  
所述的药物制剂可以是片剂、胶囊剂、注射剂或散剂等常规制剂。

## 柚皮素和柚皮苷在肿瘤放射治疗中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药产品技术领域,具体而言,涉及一种柚皮素(naringenin)和柚皮苷(naringin)在肿瘤放射治疗中的应用,特别是制备肿瘤放射治疗增敏同时降低放射性损伤的制剂的应用。

### 背景技术

[0002] 放射治疗(放疗)是肿瘤治疗中不可缺少的手段之一。在所有恶性肿瘤病人中,大约60-70%的患者在其治疗过程中要接受放射治疗。有不少肿瘤可以通过放疗手段治愈,如:早期的舌癌、鼻咽、喉癌、食管癌和宫颈癌的放疗治愈率为90%左右[Hogle WP, Semin Oncol Nurs, 22(4):212-220, (2006)]。但是放疗在杀灭肿瘤的同时,会引起正常组织(包括放射罩内正常组织及远处组织如骨髓)的非目标效应,这也是制约放疗疗效的主要原因。尽管通过改善放疗设备,提高放疗精确度,配合使用放疗增敏剂及联合化疗等手段,仍未取得满意的疗效。其主要原因是正常组织不能耐受放射性损伤,影响了放疗剂量的进一步提高,严重者可能危及患者的生命。尤其在胸部肿瘤放疗中,如肺癌,食管癌,乳腺癌和纵膈肿瘤的放射治疗,放射性肺损伤是临床上最常见并发症。

[0003] 放射性肺损伤一般表现为早期放射性肺炎和后期放射性肺纤维化两个阶段,这种损伤不仅会降低局部肿瘤控制率,严重影响患者的生活质量,由此造成的呼吸衰竭是放射性损伤的主要致死原因之一;不仅如此,放射性肺损伤引起的局部缺氧、炎症反应、血管再生、局部微环境的改变以及免疫抑制等能促进肿瘤的复发、浸润和转移[van den Brenk, H. A et al, Br J Radiol, 47(558):p. 332-336, (1974)]。由此看来,临床上对放射性肺损伤的治疗尤为重要,但是缺乏对放射性肺损伤的有效治疗药物,通常是经验性使用大剂量糖皮质激素和抗炎药进行对症处理。这些措施不但没有提高放疗的治疗效果反而引起许多副作用,如大量糖皮质激素的长期使用造成机体的免疫抑制有促进肿瘤复发和转移的风险。寻找既能预防和治疗放射性肺损伤,又能降低或阻止肿瘤复发和转移的药物是肿瘤放疗亟待解决的关键难题。

[0004] 通常认为放疗引起的效果主要是DNA损伤或者自由基的诱发发挥了杀伤肿瘤的作用[Muruve DA et al, Nature, 452(7183):103-107, (2008)], DNA碎片及活性氧也诱发了后续的炎症反应,激活的巨噬细胞合成和分泌大量炎症因子,如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8等,大量的TNF- $\alpha$ 和纤维连接素共同形成初期的急性肺炎,同时还能促进成纤维细胞增殖并分泌大量胶原;且肺照射造成肺毛细血管内皮细胞DNA断裂细胞死亡以及ROS/RNS水平升高的氧化损伤会引起HIF的蓄积,加速肿瘤细胞HIF转录翻译并上调HIF的活性[Lerman, O. Z., et al., Blood, 116(18):3669-3676, (2010)]。脉管内皮细胞(EC)由于缺氧刺激产生大量的趋化因子SDF,与受体CXCR4结合,促使BMDCs被募集到炎症损伤和缺血局部[Du, R., et al., Cancer Cell, 13(3):206-220, (2008)]。大量研究显示BMDCs对肿瘤新生血管的形成和生长至关重要,这些微环境的变化为肿瘤的复发与转移提供了有利的条件。

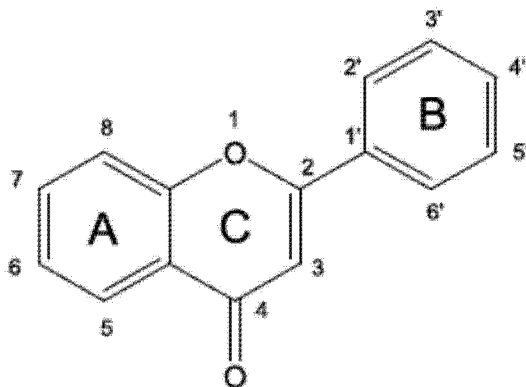
[0005] 放疗后经历了早期持续的免疫应答会引起慢性炎症,随后将开启组织重建及修复过程,正常的组织修复,炎症细胞的浸润促使肌纤维母细胞转化,促进转化生长因子 TGF- $\beta$  及组织连接生长因子 CTGF 的大量分泌,TGF- $\beta$  是一种多功能性的细胞因子,参与调控细胞的增殖、分化及细胞外基质的分泌,是纤维化发生过程中最直接的细胞因子 [Sime, P. J., et al., Am J Pathol, 153(3):825-832, (1998).]。不过放疗后的组织修复过程与正常组织受损的修复不同,放疗引起血管内皮细胞的功能失调,演变成血管病变,组织缺氧后产生不可控的增殖期,最后导致放射诱发的晚期纤维化形成。

[0006] 临床研究表明:常用的糖皮质激素类药物如地塞米松,由于具有显著的免疫抑制作用可有效缓解放射引起的早期肺炎,但最终会导致放疗效果的减弱并可加重放疗引起的肺纤维化 [Laura S., et al., Immunity, 42(4), 767 - 777, (2015)]。另外一些研究显示饮食中具有显著抗氧化作用的黄酮,多酚类及维生素 E 等也具有明显的放射保护作用,但是这些抗氧化剂对放疗的保护作用往往因为其添加后导致放射治疗作用的减弱 [Sakamoto K, et al., Br J Radiol. 46(547):538 - 540, (1973)] 或者促进了肿瘤的复发而最终放弃 [Prasad KN, et al., Nutr Cancer. 26(1):11 - 19, (1996)]。

[0007] 现有的防治放射性肺损伤药品,对放射性肺损伤有一定保护作用,但往往会减弱放疗的治疗效果,而这又是临床很难于取舍的问题。因此,临床急需既能够防治放射引起的肺损伤,又不影响放疗效果的药物。

[0008] 黄酮类化合物(结构通式如式 1 所示)具有抗氧化清除自由基的作用,此类化合物可以通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基从而终止自由基链式反应。国内外学者均发现了黄酮类化合物中的大豆异黄酮如染料木素具有显著的抗氧化清除自由基的作用,对放疗引起的损伤具有一定的保护作用,但在某些激素相关的肿瘤中染料木素具有促进肿瘤的转移的作用。这一研究发现对染料木素的未来临床应用可能受到诸多限制 [El Touny LH, et al., Cancer Res. 69(8):3695-703, (2009)]。

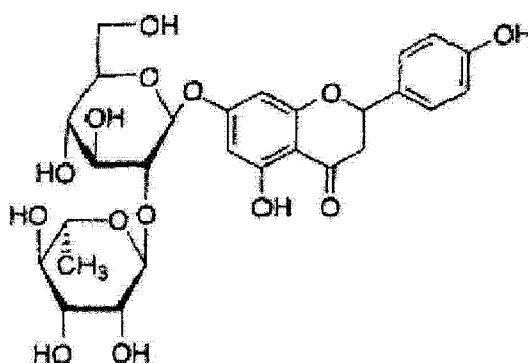
[0009]



[0010] 式 1:黄酮类化合物结构通式。

[0011] 柚皮苷(结构如式 2 所示, naringin) 又称柚苷、异橙皮苷等,分子式 C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>, 分子量 580. 53, 主要存在芸香科植物葡萄柚、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。

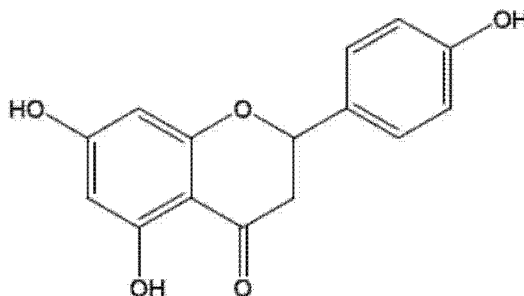
[0012]



[0013] 式 2 : 柚皮苷结构式。

[0014] 柚皮素 (naringenin, 结构如式 3 所示) 是柚皮苷的苷元, 也是柚皮苷产生药理作用的结构部分, 分子式  $C_{15}H_{12}O_5$ , 分子量 272.25, 具有抗菌、抗炎解痉和利胆等作用 [12-14], 黄酮类结构及柚皮素和柚皮苷的结构式如下:

[0015]



[0016] 式 3 : 柚皮素结构式。

[0017] 黄酮类化合物中的 B 环是其抗氧化清除自由基的主要活性部位, 当该环存在邻位羟基时, 抗氧化能力会大大提高; 2, 3 位双键有利于 B 环失去电子后形成更稳定的自由基; 4 位羰基可以与邻位羟基形成氢键, 是自由基中间体更稳定; 3, 5 位羟基属于增效酚羟基。因此, 柚皮素及柚皮苷不具备大豆异黄酮等的显著抗氧化作用 [Tuñón M. J, et al., Current Drug Metabolism, 10, 256-271, (2009)]。

[0018] 通过系统的研究, 我们前期发现柚皮素及柚皮苷通过调控 TGF- $\beta$  的分泌发挥抗纤维化及肿瘤转移的作用 [CN 101322700B; Du GJ, et al., Cancer Res 69(7):3205-3212, (2009); Lou CJ, et al, PLOS one, 7(12), e50956, (2012)], 与免疫相关的炎性细胞因子的释放发挥其防治放射引起的肺损伤及肿瘤复发和转移, 且不影响放射对肿瘤的治疗作用。

## 发明内容

[0019] 本发明涉及黄酮类小分子化合物在对肿瘤放射性治疗增敏 / 增效的同时降低放射性损伤方面的应用。

[0020] 本发明还涉及黄酮类小分子化合物在制备对肿瘤放射性治疗增敏 / 增效的同时降低放射性损伤药物的应用。

[0021] 本发明还涉及黄酮类小分子化合物通过调控与免疫相关的细胞因子的释放的功能, 从而对肿瘤放射性治疗的增敏 / 增效及减少肺损伤方面的应用。

[0022] 本发明还涉及黄酮类小分子化合物在制备调控与免疫相关的细胞因子的释放的

制剂的应用。

[0023] 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，优选为柚皮素或柚皮苷。

[0024] 所述的针对肿瘤的放射性治疗为临床适用的放射性治疗方法，例如，

[0025] 体外放射性治疗或体内放射性治疗；

[0026] 立体定向放射治疗；

[0027] 直接电离粒子型放疗或间接电离粒子型放疗；

[0028] X 线治疗机放射疗法、医用加速器放射疗法、放射性核素放射疗法等。

[0029] 所述的肿瘤优选为胸部肿瘤，如肺癌，食管癌，乳腺癌和纵膈肿瘤。

[0030] 所述的炎性细胞因子包括但不限于白介素 6 (IL-6)、白介素 1b (IL-1b)、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 。

[0031] 所述的放射性损伤为由放射导致的组织炎症、组织纤维化。

[0032] 所述的放射性损伤优选为放射性肺损伤，包括治疗早期的放射性肺炎和治疗后期的放射性肺纤维化。

[0033] 本发明还涉及以所述黄酮类小分子化合物为有效成分制备获得的针对肿瘤放射性治疗的增敏 / 增效同时降低放射性损伤的药物组合物或药物制剂；所述的药物组合物或药物制剂包括黄酮类小分子化合物，常规药用辅料，所述的药用辅料包括赋型剂、崩解剂、支持剂、缓释剂等；所述的药物制剂可以是片剂、胶囊剂、注射剂或散剂常规制剂。

#### 附图说明

[0034] 图 1 柚皮素减少 4T1 乳腺癌肺转移小鼠放疗引起肺损伤的作用

[0035] 图 2 柚皮素延长 4T1 乳腺癌肺转移小鼠放疗的生存期

[0036] 图 3 柚皮素对 4T1 乳腺癌肺转移小鼠由放射引起的免疫相关细胞因子的影响

[0037] 图 4 柚皮素对放疗 LLC 肺癌小鼠的增效作用

[0038] 图 5 柚皮素延长 LLC 肺癌小鼠放疗的生存期

[0039] 图 6 柚皮素减少 DNA 片段引起的炎症因子 IL-1 $\beta$  的释放

[0040] 图 7 柚皮素不具有明显的抗氧化清除自由基的活性

#### 具体实施方式

[0041] 实验例一：柚皮素减少 4T1 乳腺癌肺转移小鼠放疗肺损伤、调节免疫相关的细胞因子并增加放疗后小鼠的存活期

[0042] 细胞培养及动物模型建模方法：

[0043] (1) 4T1 细胞的复苏及培养：复苏 4T1 细胞前预先将细胞实验室的超净台进行紫外照射 30min，RPMI1640 培养基（含 10% 胎牛血清）放置室温备用，从液氮保存罐中取出相应的肿瘤细胞冻存管，立即放入 37 度水浴中，快速摇晃，直至完全溶解，然后将细胞悬液移入细胞培养瓶中，加入 10-15ml 培养基混悬沉淀细胞，调整细胞浓度，置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中，每天为细胞换新鲜培养基。当细胞贴壁生长至 90% 汇合度时，用 0.25% 胰酶消化，按照 1:3 的比例传代培养。实验当天，将生长状态良好，汇合度达到 90% 的 4T1 细胞用 0.25% 胰酶消化后，用 RPMI 1640+10% 胎牛血清培养

基中和胰酶,之后 800rpm 离心,弃上清后加入无菌 PBS 重悬,计数,将细胞悬液的密度调整为  $1 \times 10^5/\text{ml}$  待用。

[0044] (2) 每次吸取细胞悬液前先将其混均匀,用 1ml 无菌注射器吸取 0.3ml,接种 3 只动物,每只动物 0.1ml (即每只动物接种 1 万个 4T1 细胞)。

[0045] 实验方案(一):柚皮素减少 4T1 乳腺癌肺转移小鼠放疗引起肺损伤的作用及对免疫相关的细胞因子的影响

[0046] (1) 采用鼠源性乳腺癌细胞系 4T1 细胞株,对 Balb/C 小鼠进行尾静脉接种,形成肺部转移肿瘤,实验尾静脉接种 1 万个 4T1 细胞时,约在 10-15 天左右肺部即可看到明显的结节。

[0047] (2) 按接种为 0 天计算,在接种后第 12 天,即在对小鼠肺部进行照射前 3 天进行灌胃给予 200mg/kg 柚皮素 (Nar) (采用 1% CMC. Na 混悬),接种 14 天后一次性  $\gamma$  射线照射 12Gy 后持续给药,在接种第 28 天处死一部分实验动物取材一次,收集血液及肺组织,称取肺重,在不影响及破坏肺组织完整结构的前提下观察肺部的肿瘤结节数。分离血清检测其中的细胞因子如 IL-6、IL-1b、IFN- $\gamma$  等。肺组织主要用于进行病理切片,28 天取的肺组织主要用于观察肺损伤及炎性细胞浸润情况。余下的动物用于生存期观察。

[0048] (3) 动物组别设计

[0049] 试验共分 4 组,分别为

[0050] 1) 正常动物对照组 (Normal),

[0051] 2) 荷瘤不照射不给药组 (4T1),

[0052] 3) 荷瘤照射不给药组 (4T1+IR),

[0053] 4) 荷瘤照射给药组 (4T1+IR+Nar)。

[0054] 需荷瘤接种 4T1 细胞的动物共 3 组,每组 12 只,雌雄各半,分开饲养,每笼 6 只。

[0055] 如图 1 所示,可见,相比于不治疗和仅进行放射性治疗的组别,放射性照射治疗 + 给药组的肺部肿瘤结节数变少,同时,病理切片显示,放射治疗组的小鼠肺部组织受损,纤维化严重,而放射治疗 + 给药组的肺损伤情况得到了明显的缓解。

[0056] 如图 3 所示,相比于单一放疗照射组,柚皮素给药组的,细胞因子 IL-6、IL-1b、IFN- $\gamma$  的表达量都发生明显改变,

[0057] 实验方案(二):柚皮素延长 4T1 乳腺癌肺转移小鼠放疗的生存期

[0058] (1) 采用鼠源性乳腺癌细胞系 4T1 细胞株,对 Balb/C 小鼠进行尾静脉接种,形成肺部转移肿瘤,实验尾静脉接种 1 万个 4T1 细胞时,约在 10-15 天左右肺部即可看到明显的结节。

[0059] (2) 按接种为 0 天计算,在接种后第 12 天,即在对小鼠肺部进行照射前 3 天进行灌胃给予不同剂量 50, 100, 200mg/kg 柚皮素 (Nar) (采用 1% CMC. Na 混悬),在小鼠接种 14 天,15 天肿瘤后分两次  $\gamma$  射线照射 (8Gy  $\times$  2f),4-6 组继续灌胃给予柚皮素,7 组灌胃给予阳性药地塞米松 0.25mg/kg 联合头孢克肟 200mg/kg,给药持续到荷瘤对照组死亡,进行生存期观察。

[0060] (3) 动物组别设计

[0061] 试验共分 7 组,分别为

[0062] 1) 正常动物对照组,

[0063] 2) 荷瘤不照射不给药组,

[0064] 3) 荷瘤照射不给药组,

[0065] 4) 荷瘤照射给药 50mg/kg Nar 组。

[0066] 5) 荷瘤照射给药 100mg/kg Nar 组

[0067] 6) 荷瘤照射给药 200mg/kg Nar 组

[0068] 7) 荷瘤照射给药地塞米松 + 头孢克肟组

[0069] 需荷瘤接种 4T1 细胞的雌性动物共 6 组, 每组 12 只, 分开饲养, 每笼 6 只。

[0070] 结果如图 2 所示, 相比于单一放疗照射组, 不同剂量的柚皮素给药后, 小鼠的生存期有了显著的增加, 尤其是给药剂量 100mg/kg 时, 对放疗的增敏增效效果最好。并且, 即使是相比于阳性药物组别 (DXM&CXL), 柚皮素给药剂量为 100mg/kg 时, 对小鼠治疗后生存期的增加也有很大的改善。

[0071] 实施例二: 柚皮素对 LLC 肺癌小鼠放射性治疗的增效作用及对生存期的影响

[0072] 一、实验设计方案:

[0073] (1) 采用鼠源性肺癌细胞系 LLC 细胞株, 对 C57 小鼠进行尾静脉接种, 接种数量为 50 万, 形成肺部肿瘤, 约在 24 天左右肺部可看到明显的结节 / 出血点。

[0074] (2) 每组接种 10 只动物, 共 4 组, 分组情况如下:

[0075] 1) 正常组, 每组 10 只;

[0076] 2) LLC 荷瘤组, 每组 10 只;

[0077] 3) LLC 荷瘤 + 照射组每组 10 只;

[0078] 4) LLC 荷瘤 + 照射 + 提前 3 天给 Nar 组每组 10 只。

[0079] 按接种当日为 0 天计算,

[0080] (1) 在接种后第 12 天 (即在对小鼠肺部进行照射前 3 天), 第 4 组进行灌胃给予 100mg/kg 柚皮素 (Nar) (采用 1% CMC. Na 溶液混悬);

[0081] (2) 在接种后第 14 天, 取 3-4 组进行  $\gamma$  射线照射, 单次 12Gy/ 只;

[0082] (3) 在接种后第 15 天 (即在对小鼠肺部进行照射后 1 天), 第 4 组进行灌胃给予 100mg/kg 柚皮素 (Nar) (采用 1% CMC. Na 混悬);

[0083] (5) 在接种后第 21 天每组随机取 5 只动物进行解剖, 收集血液及肺组织, 称取肺重, 在不影响及破坏肺组织完整结构的前提下观察肺部的肿瘤结节数;

[0084] (6) 在接种后第 37 天将每组剩余的动物进行解剖, 收集血液及肺组织, 称取肺重, 在不影响及破坏肺组织完整结构的前提下观察肺部的肿瘤结节数。分离血清检测其中的炎性细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  等。肺组织主要用于进行病理切片, 观察肺损伤及炎性细胞浸润情况, 可采用免疫组化检测肺部 DNA 片段 (考察照射引起的凋亡)、胶原 (考察肺纤维化) 等的表达。在进行病理切片时可采用左肺横切, 右肺纵切的方式, 以便比较清楚完整的观察到血管、细支气管周围的变化。

[0085] 二、实验方法:

[0086] (1) 细胞复苏及培养:

[0087] 复苏 LLC 细胞前预先将细胞实验室的超净台进行紫外照射 30min, DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清 (PAA 公司)、双抗) 放置室温备用, 从液氮罐中取出 LLC 细胞冻存管, 立即放入 37 度水浴中, 快速摇晃, 直至管内细胞悬液完全溶解, 然后将细胞悬液移入细胞培



养瓶中,加入 10-15ml 培养基,混悬沉淀细胞,置 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。在维持培养过程中,每天为细胞换新鲜培养基。当细胞贴壁生长至 90%汇合度时,用 0.05%胰酶消化,按照 1:3 的比例传代培养。按照 LLC 细胞的生长状态,在复苏后传代 2 次后的细胞用于动物接瘤。

[0088] 动物接瘤当天,将生长状态良好,汇合度达到 90%的 LLC 细胞用 0.05%胰酶消化后,用 DMEM+10%胎牛血清培养基中和,离心 (900rpm,5 分钟),弃上清后加入无菌 PBS 重悬细胞团块,计数,将细胞悬液的密度调整为  $50 \times 10^5/\text{ml}$  待用。

[0089] (2) 动物接种:

[0090] 将采用已灭菌 PBS 混悬均匀的 LLC 细胞 ( $50 \times 10^5/\text{ml}$ ) 置于冰上,放于已紫外消毒 30min 的超净台中,将前天已分好组的 C57 小鼠移入实验操作间,共 12 组,每组 5 只。每次吸取细胞悬液前先将其混均匀,用 1ml 无菌注射器吸取 0.3ml,接种 3 只动物,每只动物 0.1ml;再用 1ml 无菌注射器吸取 0.2ml,接种 2 只动物,每只动物 0.1ml。

[0091] 结果如图 4、5 所示,相比于不治疗和仅进行放射性治疗的动物组别,放射性照射治疗+给药组的肺部肿瘤结节数变少,同时,病理切片显示,仅放射治疗组的小鼠肺部组织受损,纤维化严重,而放射治疗+给药组的肺损伤情况得到了明显的缓解。

[0092] 实施例三:柚皮素减少 DNA 片段引起的炎症因子 IL-1 $\beta$  的释放

[0093] 实验方法

[0094] 腹腔注射 4% Brewer Thioglycollate medium(布鲁尔巯基乙酸盐培养基)(1.5ml/mouse)。4 天后用无血清培养基 (DMEM) 冲洗小鼠腹腔 (10ml/小鼠),取出洗液,1300rpm 离心 5min,获得的细胞可直接种 24 孔板,约 200 万/孔。种板后 2 小时需将未贴壁细胞小心吹掉,剩下的贴壁细胞即为原代腹腔巨噬细胞。

[0095] 鉴定:将贴壁的细胞刮下后用流式细胞术鉴定巨噬细胞表面抗原 F4/80,抗体为 PE 标记的抗 F4/80 抗体 (ebioscience)。结果是大于 90%的贴壁细胞为巨噬细胞。

[0096] 样品处理:柚皮素 (Nar) 100 $\mu\text{M}$  预处理 2h, DNA 片段 (100ng/ml) 刺激 2h,收集细胞上清,采用 ELISA 方法检测细胞外液中炎症因子 IL-1 $\beta$  的浓度 (pg/ml)。

[0097] 结果如图 6 所示,柚皮素能够显著的减少炎症因子的释放。

[0098] 实施例四:柚皮素等几种黄酮类化合物抗氧化作用。

[0099] 利用总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP 法) 对几种黄酮类化合物的总抗氧化能力进行检测,FRAP 法测定抗氧化能力的原理是酸性条件下抗氧化物可以还原 Ferric-tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) 产生蓝色的 Fe<sup>2+</sup>-TPTZ,在 593nm 波长测定蓝色的 Fe<sup>2+</sup>-TPTZ,即可获得样品中的抗氧化能力。由于反应在酸性条件下进行,可以抑制内源性的一些干扰因素。

[0100] 试验方法

[0101] 1. FRAP 工作液的配制:

[0102] (1) 参考下表,根据待测样品的数量 (含标准曲线) 配置适量 FRAP 工作液:

[0103]

	1 个检测	5 个检测	10 个检测	20 个检测	50 个检测
TPTZ 稀释液	150 $\mu$ l	750 $\mu$ l	1500 $\mu$ l	3000 $\mu$ l	7500 $\mu$ l
TPTZ 溶液	15 $\mu$ l	75 $\mu$ l	150 $\mu$ l	300 $\mu$ l	750 $\mu$ l
充分混匀后再加入检测缓冲液					
检测缓冲液	15 $\mu$ l	75 $\mu$ l	150 $\mu$ l	300 $\mu$ l	750 $\mu$ l
FRAP 工作液	180 $\mu$ l	900 $\mu$ l	1800 $\mu$ l	3600 $\mu$ l	9000 $\mu$ l

[0104] FRAP 工作液配制后 37 度孵育,在 1-2 小时内使用完毕。

[0105] 2. 待测样品的准备

[0106] 取黄酮类化合物 10 种分别是槲皮素 (Que),大豆黄素 (Dai),山奈酚 (Kae),芹菜素 (Api),柚皮素 (Nar),染料木素 (Gen),橙皮苷 (Her),木犀草素 (Lut),白杨黄素 (Chr),川陈皮素 (Nob) 配置终浓度为 27  $\mu$  M。

[0107] 3. 保准曲线测定的制备:

[0108] 称取 27.8mg 本试剂盒提供的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,溶解并定容到 1ml,此时浓度为 100mM,取适量  $\text{FeSO}_4$ 溶液稀释至 0.15,0.3,0.6,1.2 和 1.5mM,可以使用蒸馏水或样品配制溶液配制标准品, $\text{FeSO}_4$ 溶液宜新鲜配制使用。

[0109] 4. 抗氧化能力的测定:

[0110] (1)96 孔板的每个检测孔加入 180  $\mu$  l FRAP 工作液

[0111] (2) 空白对照孔加入 5  $\mu$  l 蒸馏水或者 PBS 等适当溶液,标准曲线检测孔加入 5  $\mu$  l 各种浓度的  $\text{FeSO}_4$ 标准溶液;样品检测孔加入 5 $\mu$ l 各种样品或者 0.15mM 的 Trlox 作为阳性对照,轻轻摇匀。

[0112] (3)37 度孵育 3-5min 在 593nm 检测吸光值。

[0113] (4) 根据标准曲线计算出样品的抗氧化能力。

[0114] (5) 抗氧化能力的表示方式:对于 FRAP 方法,抗氧化能力用  $\text{FeSO}_4$ 标准溶液来表示。

[0115] 结果如图 7 所示,柚皮素的抗氧化能力极弱,说明柚皮素对放射治疗的增敏 / 增效调节和对肺损伤的缓解,并非通过抗氧化,抵抗放疗照射产生的自由基导致。

[0116] 最后需要说明的是,以上实施例仅供本领域技术人员理解本发明的实质,并不用作对本法保护范围的限定。

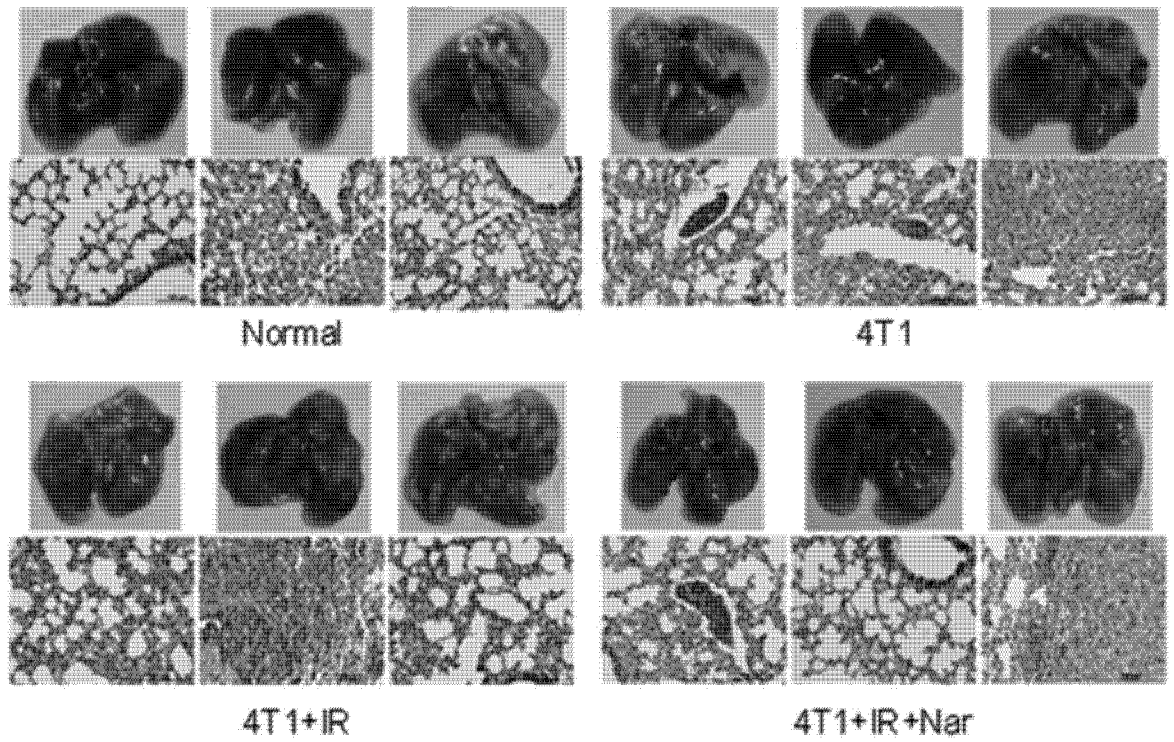


图 1

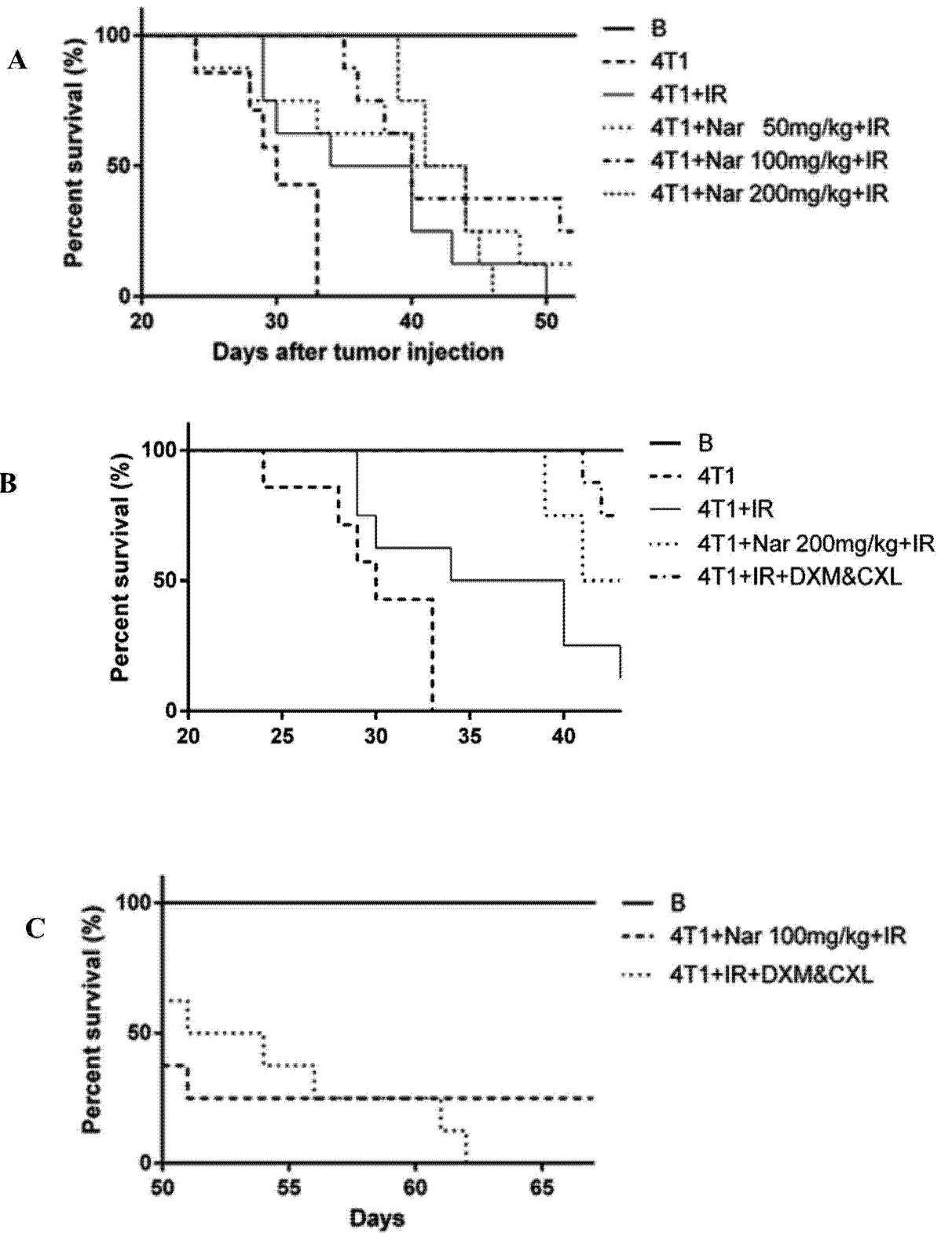


图 2

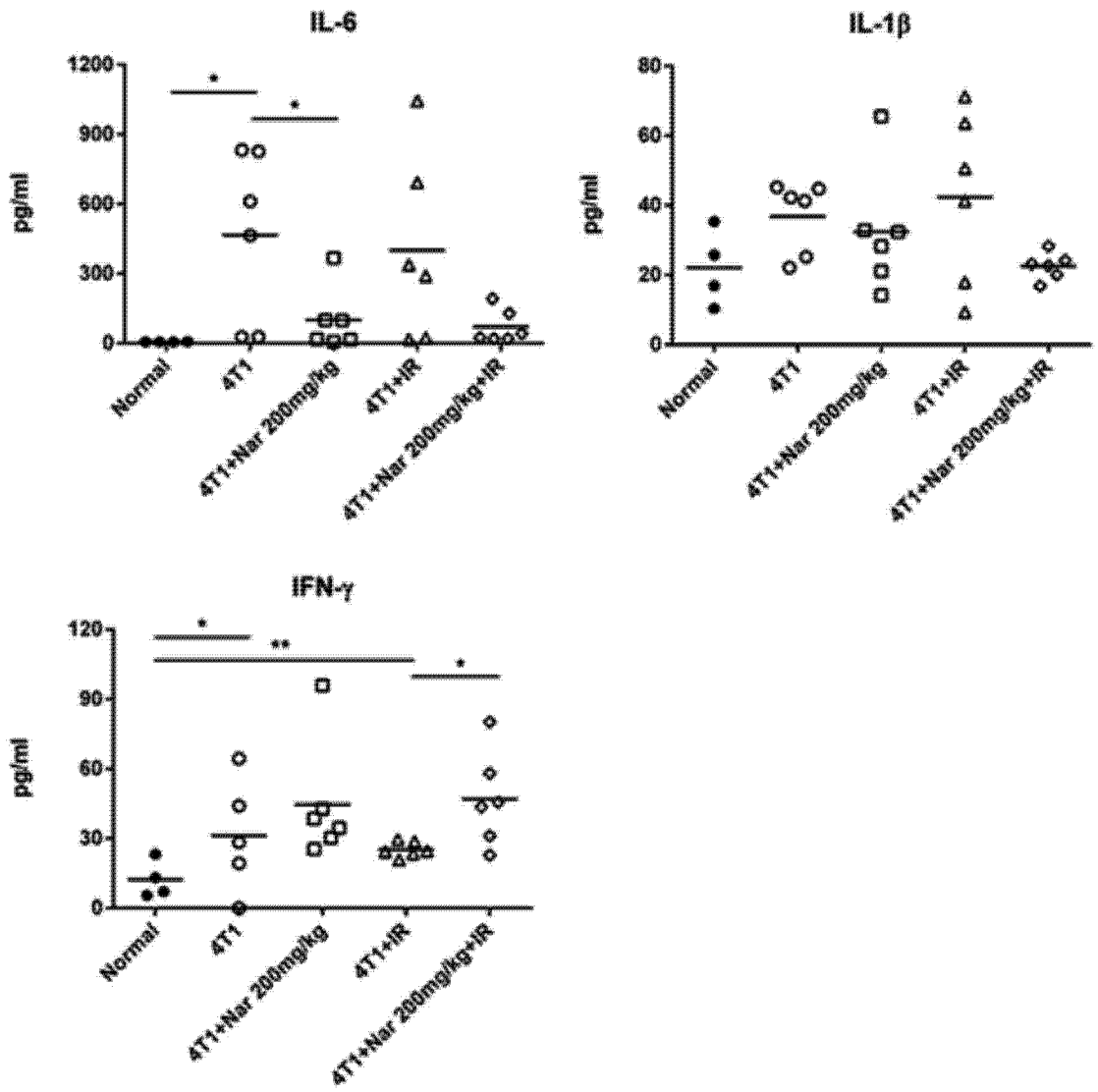


图 3

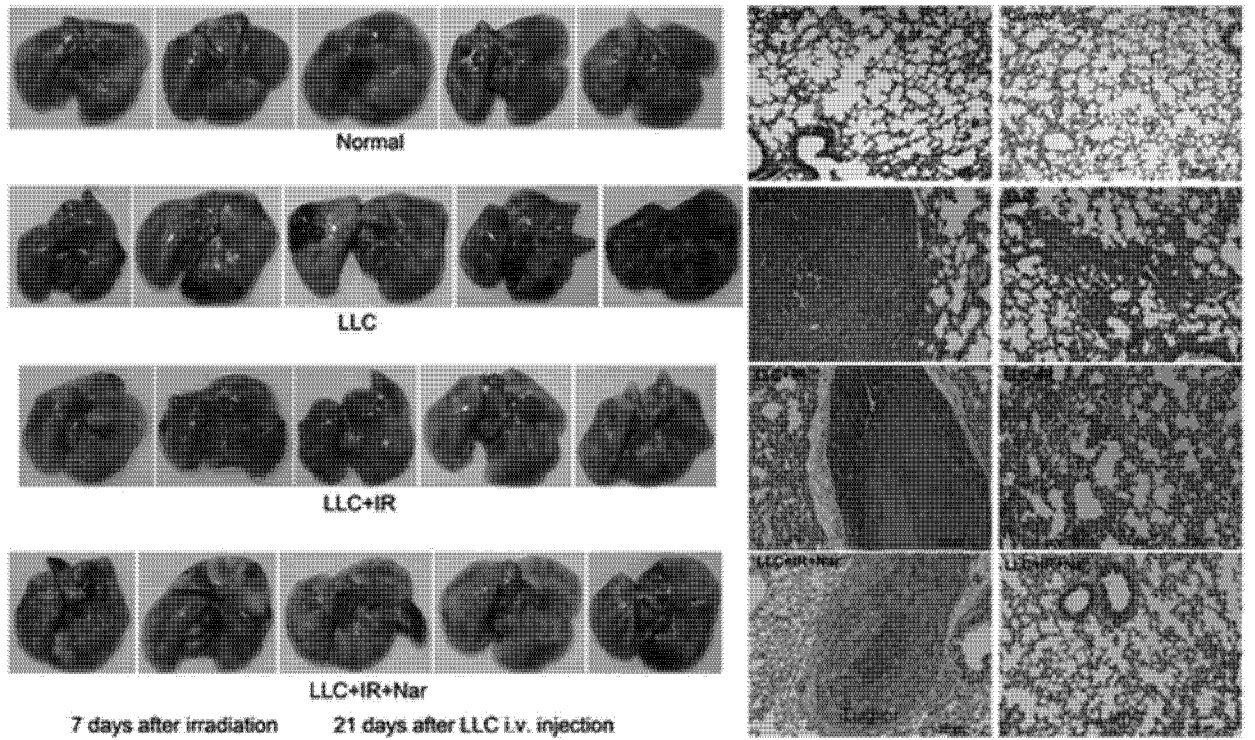


图 4

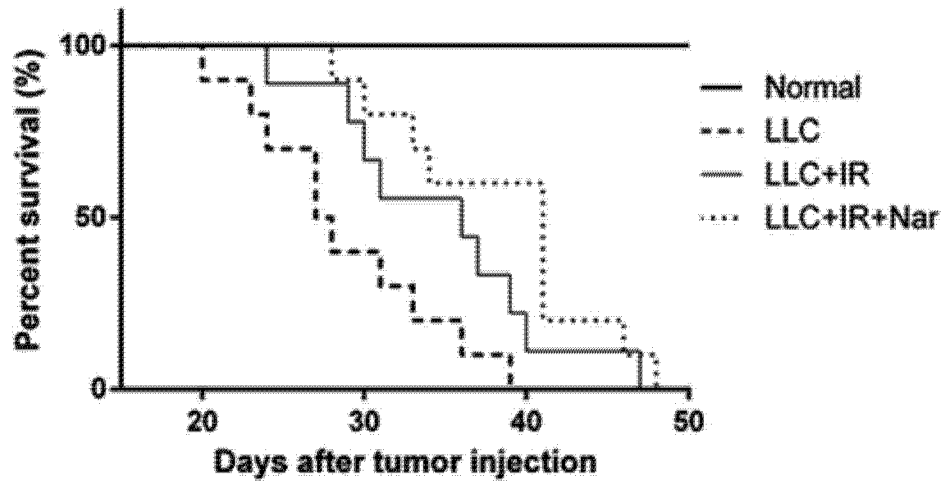


图 5

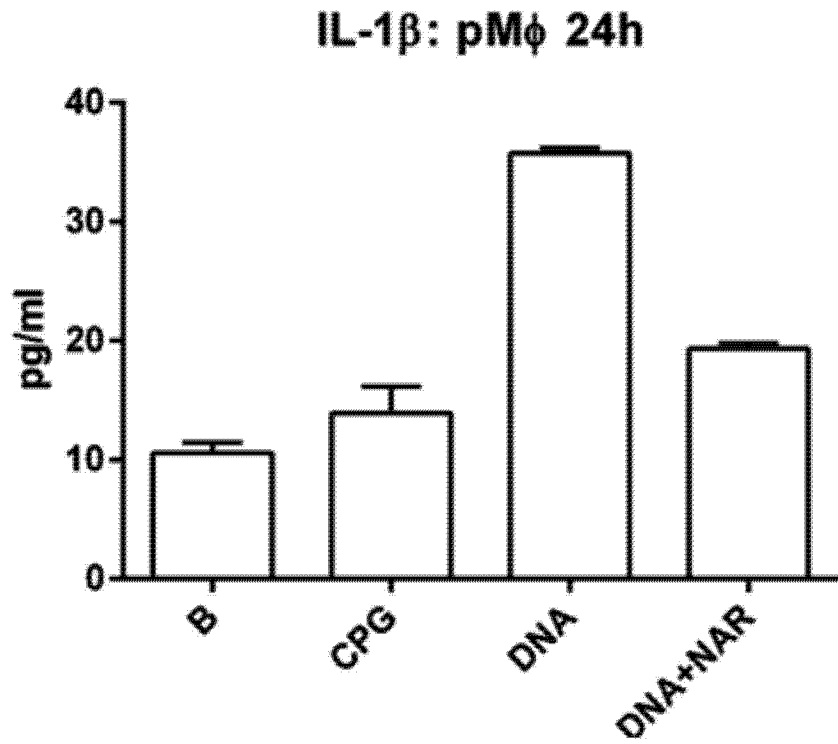


图 6

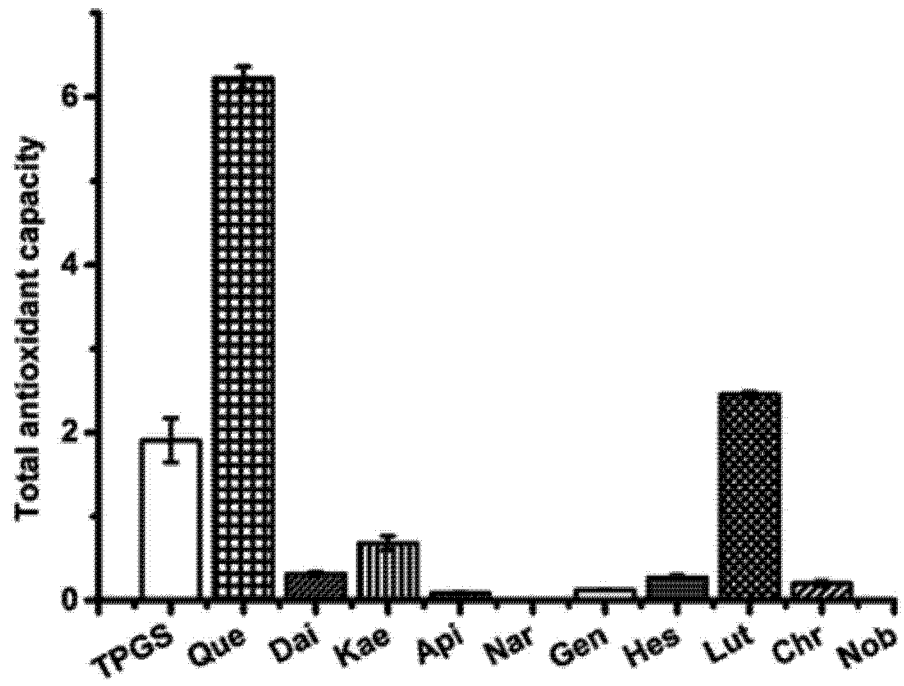


图 7