



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118576620 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202410647895.1

(22) 申请日 2024.05.23

(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院

地址 400016 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

(72) 发明人 廖奎 吴优逸 陈丹

(74) 专利代理机构 重庆乐泰知识产权代理事务所(普通合伙) 50221

专利代理师 刘佳

(51) Int. Cl.

A61K 33/243 (2019.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 15/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图9页

(54) 发明名称

双氢青蒿素用作与顺铂联合治疗三阴性乳腺癌药剂的用途

(57) 摘要

本发明公开一种双氢青蒿素在制造治疗三阴性乳腺癌药物中的用途,所述用途是指双氢青蒿素与顺铂联合用药方式给三阴性乳腺癌患者服用,联合放射疗法,以增强三阴性乳腺癌对放射线的敏感性。该用途通过双氢青蒿素(DHA)和顺铂(DDP)联合使用,提高三阴性乳腺癌细胞对放射射线的敏感性,从而提高放射治疗的疗效和减少放射治疗的副作用。

1. 一种双氢青蒿素在制造治疗三阴性乳腺癌药物中的用途,所述用途是指双氢青蒿素与顺铂联合用药方式给三阴性乳腺癌患者服用。
2. 如权利要求1所述的用途,所述联合用药,包括双氢青蒿素与顺铂同时给药,或者不分先后顺序间隔给药。
3. 如权利要求1所述的用途,双氢青蒿素联合顺铂联合用药可作为三阴性乳腺癌放疗增敏剂。
4. 如权利要求1-3所述的任一用途,双氢青蒿素与顺铂联用重量比为(3:7) - (5:5)。
5. 如权利要求4所述的用途,所述双氢青蒿素与顺铂联用重量比为3:7。

双氢青蒿素用作与顺铂联合治疗三阴性乳腺癌药剂的用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及一种双氢青蒿素用作与顺铂联合治疗三阴性乳腺癌药剂的用途。

背景技术

[0002] 三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer, TNBC)是目前临床上预后很差的乳腺癌,容易发生脑转移、骨转移等情况。三阴性乳腺癌是指雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体均为阴性的乳腺癌,是一种特殊类型的乳腺癌。三阴性乳腺癌Ⅱ期5年生存率在50%-60%左右,三阴性乳腺癌Ⅱ期意味着肿瘤>2cm,同时合并了淋巴结转移的情况。这种情况的三阴性乳腺癌是需要通过术后辅助化疗的,当然首先是根治性手术切除,其次还需要配合局部的放射治疗,以及全身的化疗,化疗需要做4-6个周期,最后可以采用观察的策略。

[0003] 目前,三阴性乳腺癌的治疗主要包括手术治疗、化疗、放疗、内分泌治疗、靶向治疗等。

[0004] 手术治疗,对于早期的三阴性乳腺癌,手术治疗是主要的治疗方法,常用的术式为乳腺癌改良根治术,在手术后还需要根据患者的病情配合放疗、化疗等治疗。

[0005] 化疗是通过使用化学治疗药物杀灭癌细胞达到治疗目的,是目前治疗癌症最有效的手段之一。化疗药物可以作用于癌细胞的DNA,导致DNA的损伤,使癌细胞死亡,从而达到治疗的效果。常用的化疗药物有顺铂、卡铂、紫杉醇、多西他赛等。

[0006] 放疗是通过高能射线来杀死癌细胞,可分为根治性放疗、姑息性放疗、术前放疗、术后放疗等。

[0007] 内分泌治疗是指使用药物或者激素抑制卵巢功能,从而调节患者体内的激素水平,降低乳腺癌术后的复发率。常用的药物有枸橼酸他莫昔芬片、枸橼酸托瑞米芬片、来曲唑片等。

[0008] 靶向治疗是指通过靶向药物,选择性抑制肿瘤细胞的生长和扩散,从而达到治疗的目的。常用的靶向药物有曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、拉帕替尼等。

[0009] 化疗和放疗仍然是三阴乳腺癌治疗的主要手段。但化疗仍然会产生耐药性,放疗会给正常细胞产生杀伤力,在杀死癌细胞的同时也损害正常组织细胞。如何增加肿瘤组织对射线的敏感性,减少放射剂量,以减少对正常组织的损伤一直是人们探索的问题。

[0010] 癌细胞对放疗的抵抗性往往会导致放疗失败,影响治疗效果,且乳腺临近心脏、肺等重要器官,为提高局部控制率而一味增加射线剂量,会导致严重的心脏毒性和放射性肺炎等副反应。

[0011] 目前,顺铂(Cisplatin, DDP)作为临床化疗一线药物联合放疗使用可以提高放疗治疗的效果,但其有着较强的肝肾毒性、耳毒性,并未显示出最高的治疗潜力。在此背景下,迫切需要开发高效低毒的新型治疗方法,中药联合一线化疗药物治疗肿瘤是目前的研究热点,联合用药不仅可以减少传统化疗药物的剂量、减轻毒副反应,并能提高放疗疗效。

[0012] 青蒿素 (Artemisinin) 是我国药学工作者从菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。其化学结构经过改进、修饰,先后发展了青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚和双氢青蒿素 (Dihydroartemisinin, DHA) 等多种衍生物。DHA 具有吸收性好、代谢和排泄迅速、抗癌活性的特点,并且具有明显的肿瘤选择性,对正常细胞的毒性也极低。目前, DHA 作为抗癌药物和治疗性增敏剂被用于基础和临床研究,但是, DHA 与顺铂联用对恶性肿瘤的放疗增敏作用却未见报道。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于提供一种双氢青蒿素在制造治疗三阴性乳腺癌药物中的用途,所述用途是指双氢青蒿素与顺铂联合用药方式给三阴性乳腺癌患者服用。

[0014] 本发明的用途是为提升三阴性乳腺癌细胞的放疗治疗效果,通过双氢青蒿素 (DHA) 和顺铂 (DDP) 联合使用,提高三阴性乳腺癌细胞对放射射线的敏感性,从而提高放疗的疗效或/和减少放疗的副作用。

[0015] 本发明的一种双氢青蒿素在制造治疗三阴性乳腺癌药物中的用途,所述用途是指双氢青蒿素与顺铂联合用药方式给三阴性乳腺癌患者服用。

[0016] 上述本发明的用途,所述联合用药,包括双氢青蒿素与顺铂同时给药,或者不分先后顺序间隔给药。

[0017] 上述本发明的用途,双氢青蒿素联合顺铂联合用药可作为三阴性乳腺癌放疗增敏剂。

[0018] 本发明的用途,通过采用流式细胞仪检测双氢青蒿素 (DHA) 和顺铂 (DDP)、希美钠 (CNMa) 分别单独使用以及联合使用时对 BT549 细胞周期和凋亡的影响;细胞划痕愈合实验、Transwell 实验检测 DHA 和 DDP、CNMa 分别单独使用以及联合使用时对 BT549 细胞迁移、侵袭能力的影响;检测 DHA 和 DDP、CNMa 分别单独使用以及联合使用时 BT549 细胞内的活性氧 (ROS) 含量。

[0019] 因此,双氢青蒿素联合顺铂应用可作为放疗增敏剂以提高三阴性乳腺癌 BT549 细胞放疗敏感性,从而通过提高放疗疗效,和/或通过减少放射剂量以减少对正常细胞的杀伤力即减少放疗的副作用。

附图说明

[0020] 图1为实施例1的DHA和DDP联用对BT549细胞凋亡实验效果对比图;

[0021] 图2为实施例2的DHA和DDP联用对BT549细胞周期阻滞实验效果对比图;

[0022] 图3为实施例3的DHA和DDP联用对BT549细胞活性氧 (ROS) 含量效果对比图;

[0023] 图4为实施例4的DHA和DDP联用对BT549细胞划痕愈合实验各组细胞的运动迁移能力对比图;

[0024] 图5为实施例5的DHA和DDP联用在Transwell实验中对各组BT549细胞的侵袭能力抑制效果对比图;

[0025] 图6为实施例6的DHA和DDP不同配比联用对BT549细胞周期阻滞实验效果对比图;

[0026] 图7为实施例6的DHA和DDP不同比例联用对BT549细胞凋亡效果对比图;

[0027] 图8为实施例6的DHA和DDP不同比例联用对BT549细胞24h划痕实验效果对比图;

[0028] 图9为实施例6的DHA和DDP不同比例联用在Transwell实验中对BT549细胞的侵袭能力抑制效果对比图;

[0029] 图10为实施例6的DHA和DDP不同比例联用对BT549细胞活性氧(ROS)含量效果对比图。

具体实施方式

[0030] 以下实施例用于进一步说明和理解本发明的精神实质,但不以任何方式限制本发明的范围。

[0031] 以下实施例的实验材料:

[0032] 三阴性乳腺癌BT549细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,并在重庆医科大学实验室常规培养,培养条件37℃、5%CO₂、95%湿度,普诺赛BT549细胞专用培养液(RPMI-1640+10%FBS+10ug/ml Insulin+1%P/S)。

[0033] 基础培养基RPMI-1640(Gibco),胎牛血清(Biosharp),PBS(Biosharp),0.1%结晶紫染液(碧云天),4%多聚甲醛(Biosharp),0.25% Trypsin-EDTA(Gibco),0.25% Trypsin-EDTA Free(Biosharp),基质胶5ml(美国康宁公司)。DHA(10μM in DMSO)、顺铂购自上海麦克林,注射用甘氨双唑钠购自上海复旦复华。六孔板、24孔板及96孔板购自安徽甄选。细胞凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒、ROS检测试剂盒购自大连美仑。CCK-8试剂盒购自上海浦予。Transwell 8μm小室购自美国康宁。

[0034] 射线来源Varian直线加速器6Mv 6Gy X-ray,剂量率4Gy/min,源表面距离100cm。

[0035] 实施例1细胞凋亡实验

[0036] 采用流式细胞术检测细胞凋亡

[0037] 取对数生长期的三阴性乳腺癌BT549细胞接种于六孔板,待细胞生长密度为80%时,采用总辐射量为40Gy的X射线(2Gy/天,连续20天,剂量率为4Gy/min,源表面距离100cm),在最后一次照射后培养24h,分组分别添加药DHA、DDP、CNMa、DHA+DDP、DHA+CNMa和空白对照处理,给予X线处理(2Gy/天,剂量率为4Gy/min,源表面距离100cm),培养24h。用不含EDTA的胰酶(Biosharp)消化细胞离心收集,PBS洗涤离心收集两次,1X Binding buffer重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,加入5μl Annexin-V FITC和10μl PI,室温避光孵育15min,加入400μl 1X Binding buffer,1h内流式细胞仪上机。

[0038] 细胞凋亡为基因调控的程序性死亡,而肿瘤细胞由于凋亡通路的重要靶点表达改变,可能为肿瘤细胞原发性或获得性耐药的机制,以诱导凋亡为靶点的肿瘤治疗是一大研究热点。

[0039] 实验结果如图1所示,结果显示DHA诱导细胞凋亡略优于DDP、CNMa和空白对照组,联合用药中DHA+DDP诱导凋亡明显增加,DHA+CNMa高于单药,但劣于DHA+DDP。

[0040] 实施例2细胞周期实验

[0041] 采用流式细胞术检测细胞周期

[0042] 取对数生长期的细胞接种于六孔板,培养24h,细胞贴壁后,分组分别加药DHA、DDP、CNMa、DHA+DDP、DHA+CNMa和空白对照处理24h。胰酶消化细胞离心收集,PBS洗涤离心收集两次,75%乙醇4℃固定过夜。预冷PBS洗涤,加入染色工作液(500μl Buffer,25μl 20X PI,10μl 50X RNase A),37℃避光孵育30min,4℃避光存放,24h内流式细胞仪上机。

[0043] 目前国际放射肿瘤学公认处于细胞周期中G1、G2期的细胞对于射线敏感,S期细胞因可进行DNA双链修复响应辐射应激而对于射线不敏感,即细胞损伤较小。因此,测定细胞周期可判断细胞辐射敏感性。

[0044] 实验结果如图2所示,

[0045] 各药物实验组的各周期细胞占比为:

[0046]	DHA	DDP	CNMa
	Dip G1:54.69%	Dip G1:57.13%	Dip G1:43.62%
	Dip S:32.95%	Dip S:30.32%	Dip S:24.60%
	Dip G2:12.36%	Dip G2:12.55%	Dip G2:31.78%
[0047]	DHA+DDP	DHA+CNMa	对照组
	Dip G1:83.69%	Dip G1:65.37%	Dip G1:43.3%
	Dip S:14.95%	Dip S:2.05%	Dip S:52.95%
	Dip G2:1.36%	Dip G2:32.58%	Dip G2:3.75%

[0048] 结果表明:本实验可见与单药对比中,药物提高BT549细胞辐射敏感性的作用中DHA和DDP明显优于CNMa,DDP略高于DHA,CNMa和空白对照组无明显差异。联合用药中,DHA+DDP远远优于DHA+CNMa,且远远优于单药。

[0049] 实施例3细胞活性氧实验

[0050] 采用流式细胞术检测细胞活性氧

[0051] 取对数生长期的细胞接种于六孔板,贴壁后,分组分别加药DHA、DDP、CNMa、DHA+DDP、DHA+CNMa和空白对照处理,并给予X线处理,细胞融合度50%-70%时,每孔加入1ml DCFH-DA (10 μ M) 探针装载,37 $^{\circ}$ C避光孵育30min,基础培养基洗涤3次,加药物诱导孵育2h,胰酶消化离心收集细胞,1h内流式细胞仪上机。

[0052] ROS是细胞辐射损伤的起始因素。射线作用于细胞内生物大分子如蛋白质或DNA、以及水分子,产生自由基或ROS,导致脂质过氧化或膜蛋白结构受损,氧化应激造成细胞损伤。

[0053] 结果如图3所示,结果显示药物及射线处理2h后,各组细胞内部均产生ROS。联合用药对比单药处理,波峰右移,对比对照组,波峰明显右移;DHA+DDP略优于DHA+CNMa。

[0054] 实施例4细胞愈合实验

[0055] 取对数生长期的细胞接种于六孔板,细胞融合度100%,200 μ l枪头垂直划痕,PBS清洗,基础培养基培养,加药并给予X线处理,定时拍照。

[0056] 细胞受到细胞内外刺激后迁移,参与肿瘤恶化转移。细胞迁移是评估肿瘤治疗疗效的重要手段。

[0057] 实验结果如图4所示,结果表明,三种单药处理组24h愈合迁移面积无明显差异,三种单药愈合迁移面积小于对照组,DHA+DDP联合用药组愈合迁移面积远小于单药组和对照组,小于DHA+CNMa组。

[0058] 实施例5Transwell实验

[0059] 取对数生长期细胞,用基础培养基饥饿培养24h。基质胶包被小室,接种细胞50000cells/孔,培养24h,分组分别加药DHA、DDP、CNMa、DHA+DDP、DHA+CNMa和空白对照处理,并给予X线处理,培养24h。4%多聚甲醛固定30min,PBS清洗,0.1%结晶紫染色30min,

PBS洗涤3次,晾干后采用正置显微镜拍照。

[0060] 肿瘤细胞侵袭发生是其发生原位突破基底膜,侵入淋巴管、血管,发生远处转移的基础。以Transwell小室聚碳酸酯膜和基质胶模拟体内细胞外基质,测定肿瘤细胞分泌水解酶清除运动障碍的能力。

[0061] 实验结果如图5所示,结果显示DHA和DDP抑制肿瘤侵袭优于CNMa,但DHA与DDP之间差异不具有统计学意义($P>0.05$),三种单药处理组抑制肿瘤侵袭能力均优于对照组,联合用药可进一步抑制细胞侵袭,DHA+DDP组最优。

[0062] 实施例6DHA与DDP不同比例联合使用对放射增敏效果

[0063] 参照实验例1-5的方法,实验DHA与DDP以不同重量比如1:9、2:8、3:7、4:6、5:5($\mu\text{g}/\text{mL}$)联合使用分别对BT549细胞进行细胞周期阻滞实验、细胞凋亡实验、细胞划痕(24H划痕)实验、Transwell实验、活性氧实验。其中,细胞周期实验结果如下表1和图6。细胞凋亡实验、细胞划痕(24H划痕)实验、Transwell实验、活性氧实验结果如图7-10所示。

[0064] 表1

细胞周期	DHA 与 DDP 联合使用比例及各周期细胞占比 (%)				
	1: 9	2: 8	3: 7	4: 6	5: 5
G1	67.57	71.47	89.10	76.36	76.32
S	22.06	12.47	9.62	21.22	6.23
G2	10.37	16.06	1.28	2.42	17.45

[0066] 以上实验结果表明DHA与DDP以不同比例如1:9、2:8、3:7、4:6、5:5联合使用对BT549细胞放射均具有增敏作用,但3:7、4:6、5:5三种比例增敏效果较好,3:7比例增敏效果最佳。

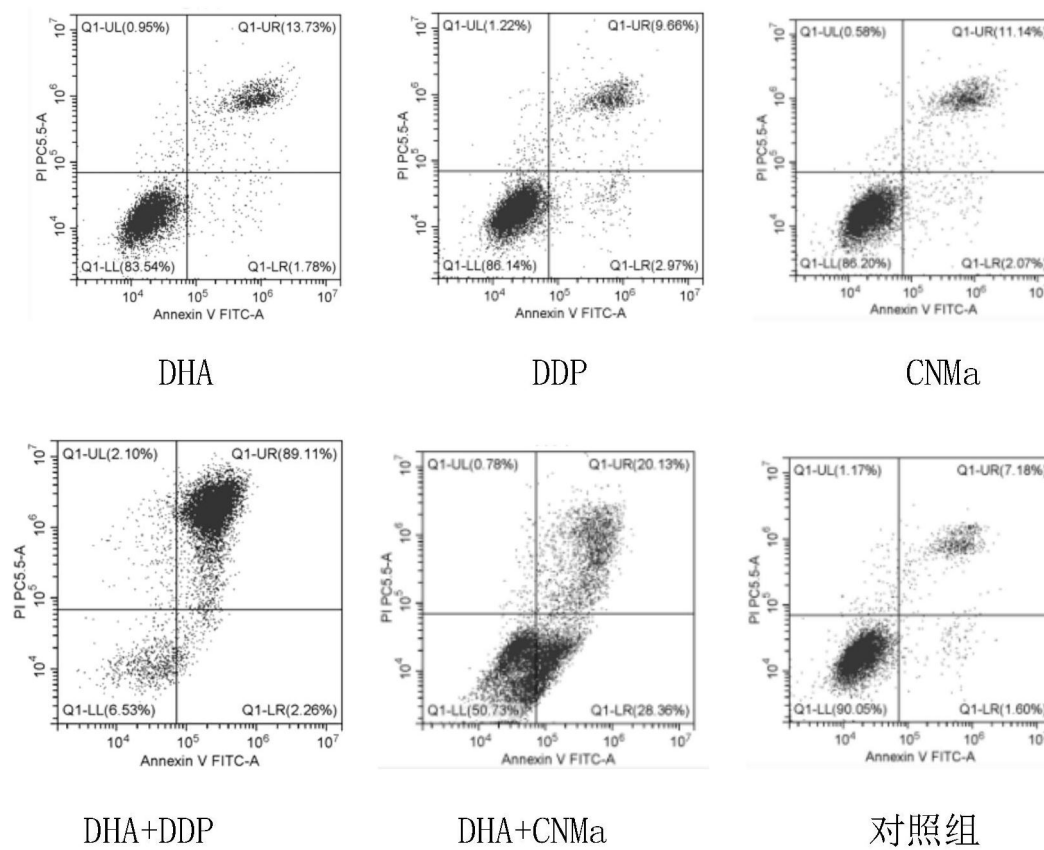


图1

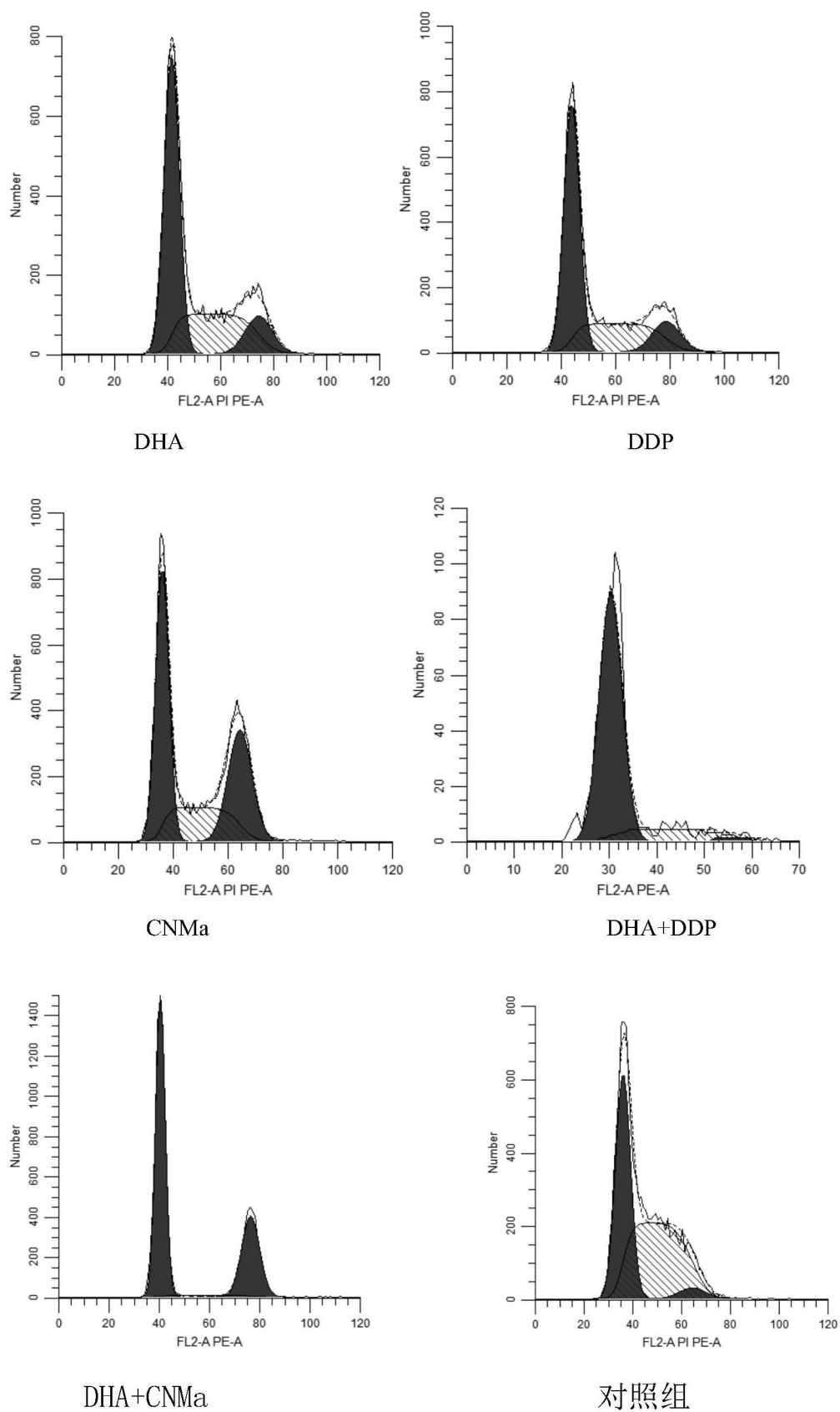


图2

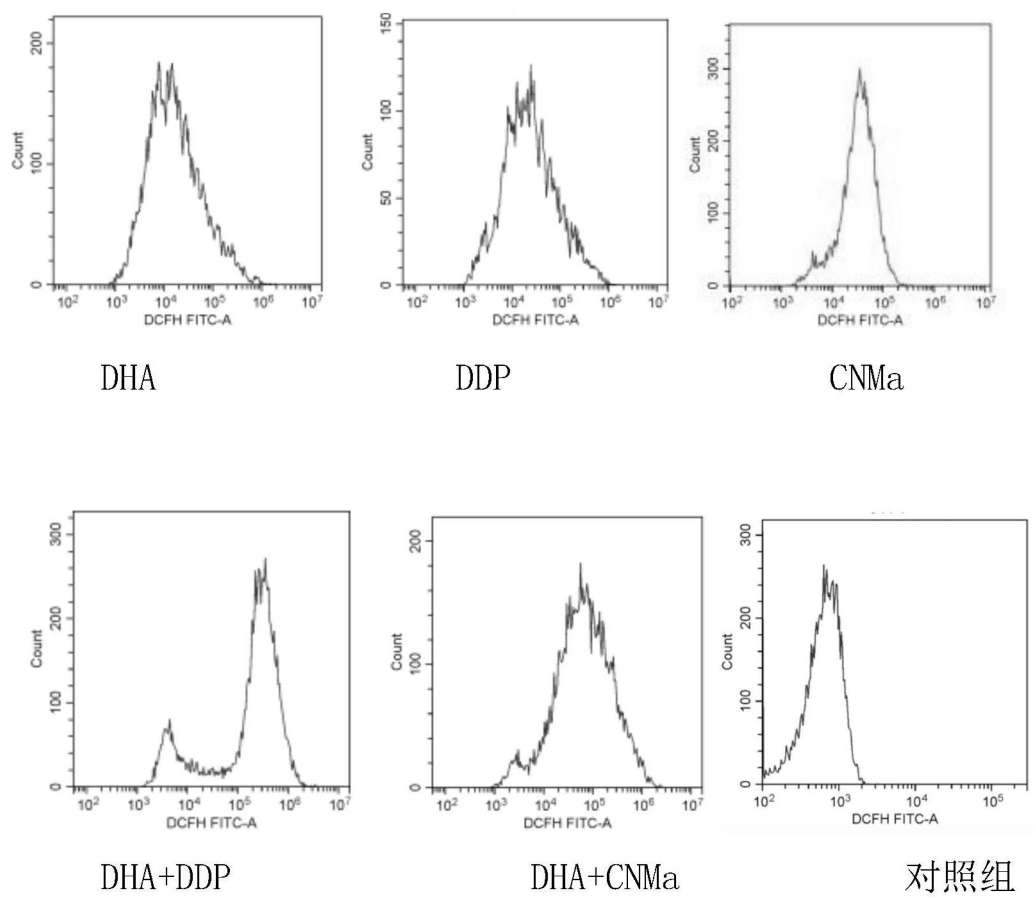


图3

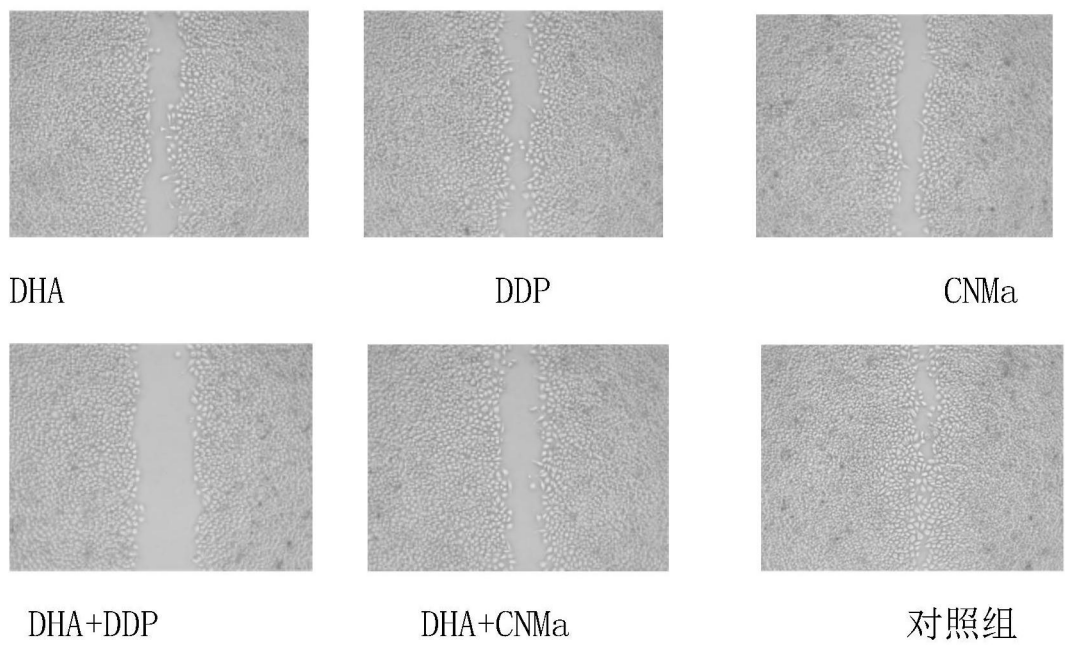


图4

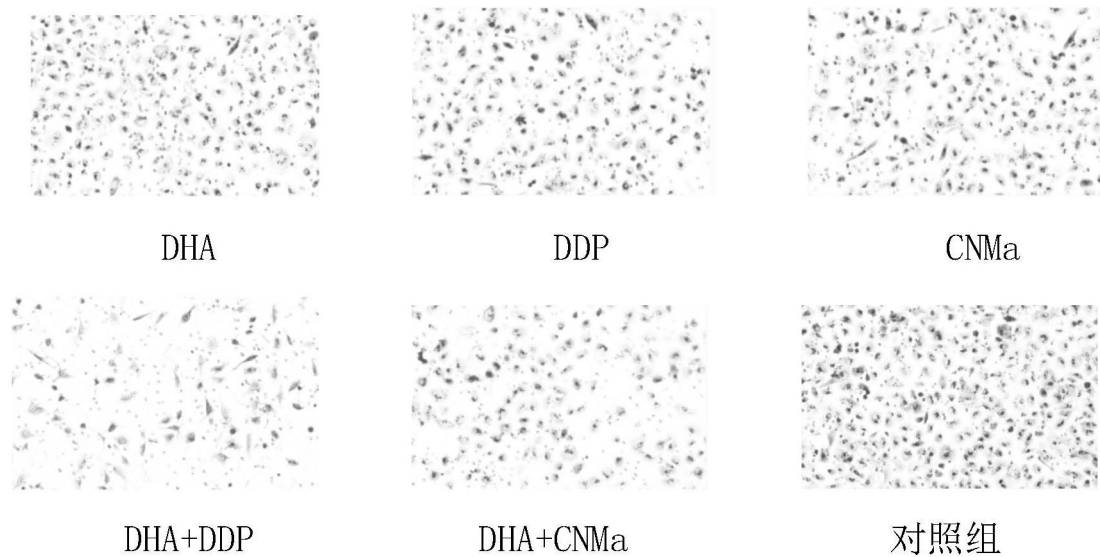


图5

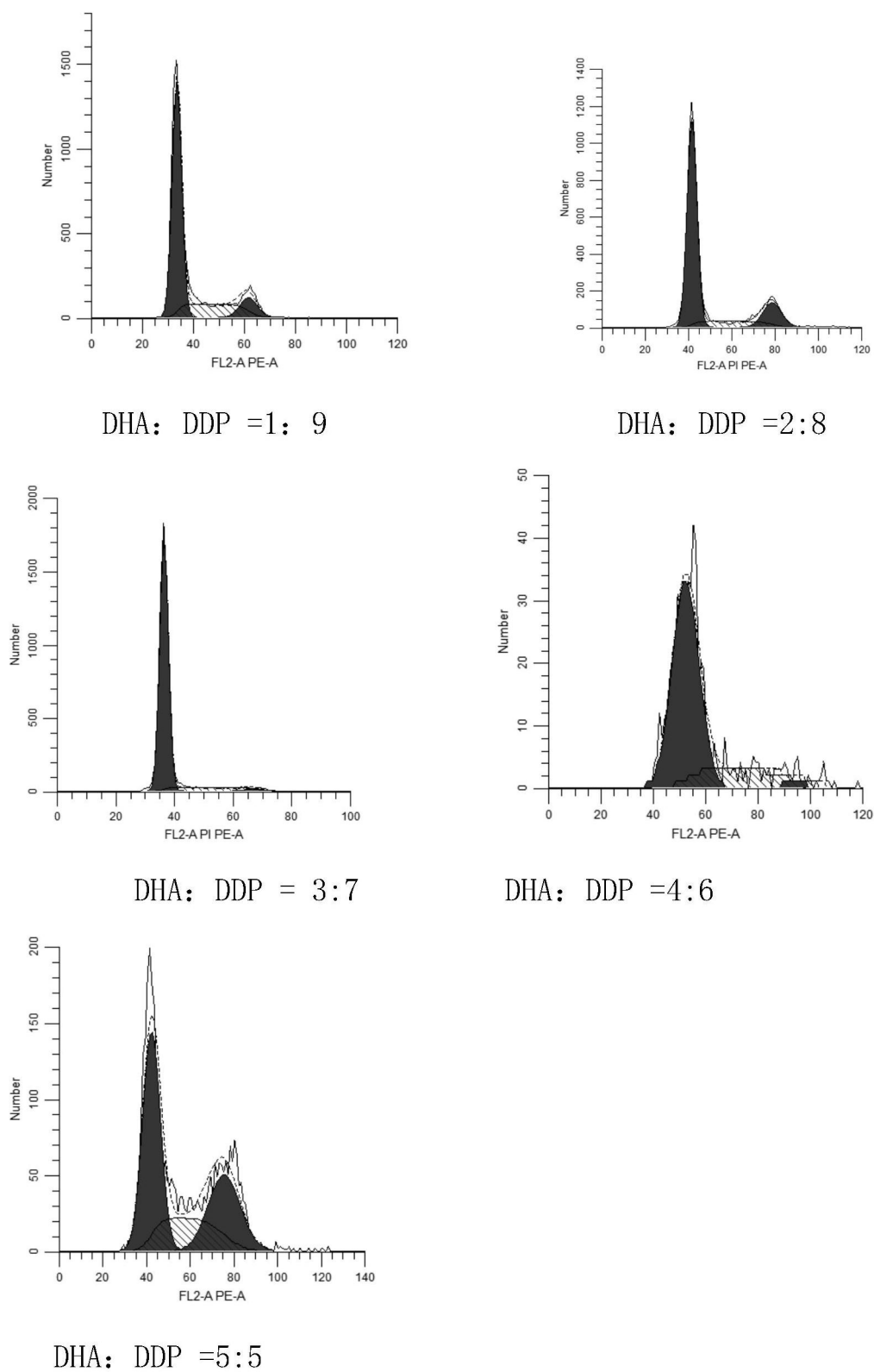


图6

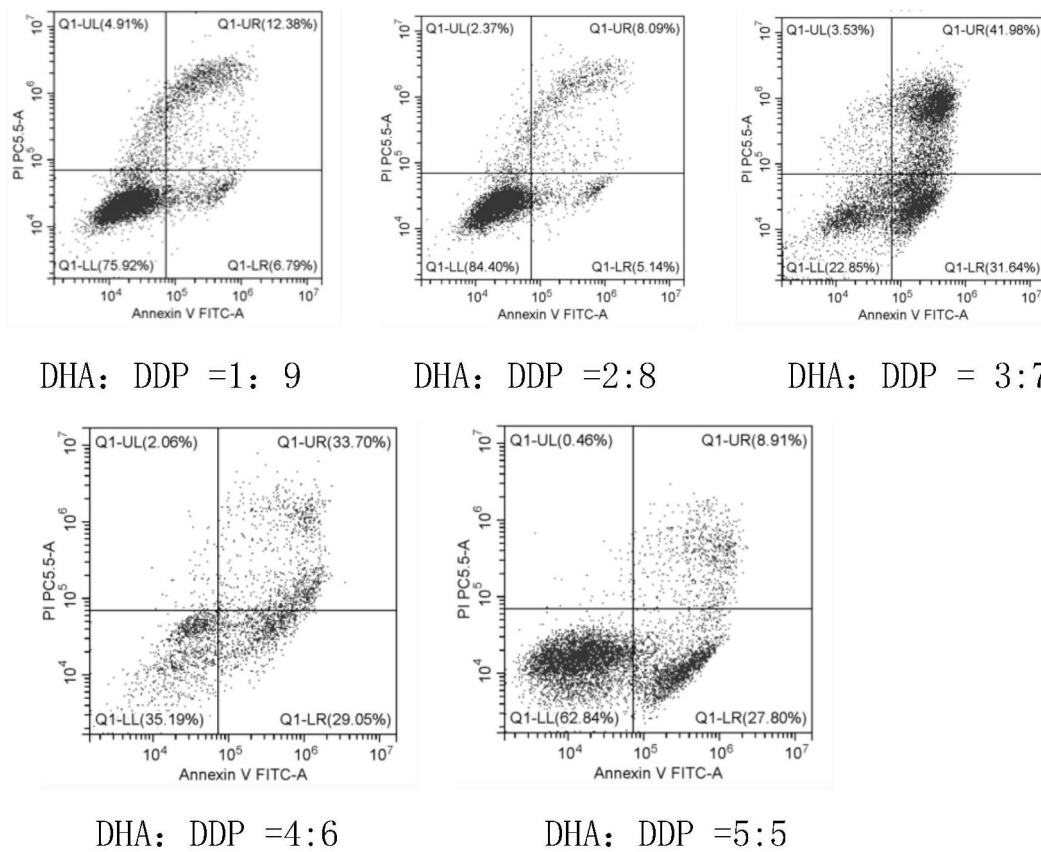
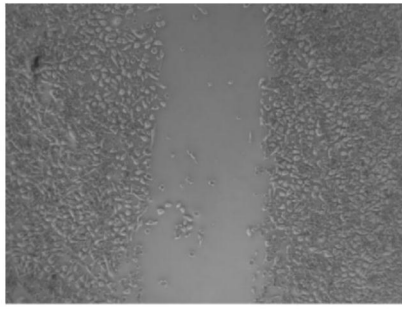
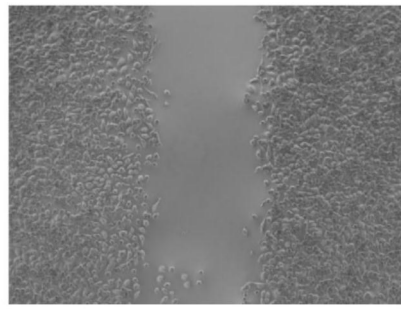


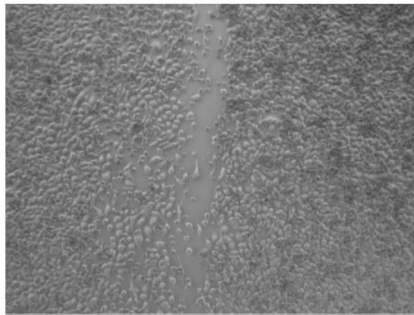
图7



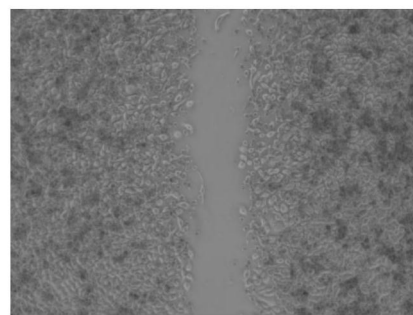
DHA: DDP = 1: 9



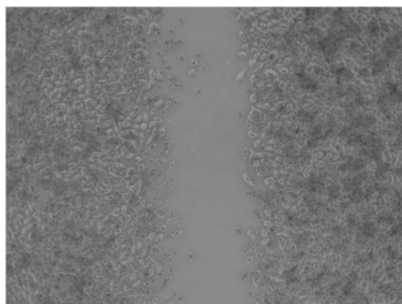
DHA: DDP = 2: 8



DHA: DDP = 3: 7

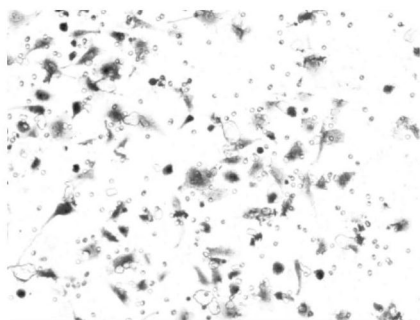


DHA: DDP = 4: 6

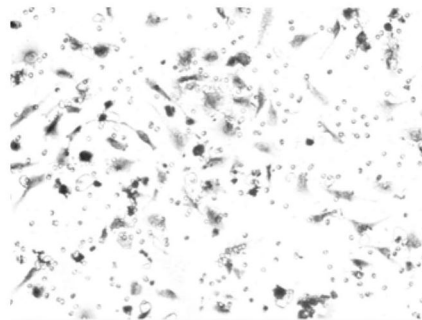


DHA: DDP = 5: 5

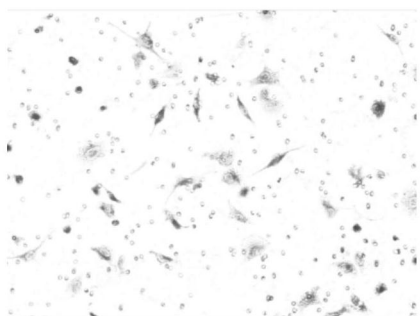
图8



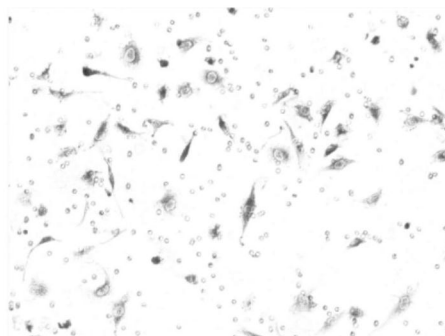
DHA: DDP =1: 9



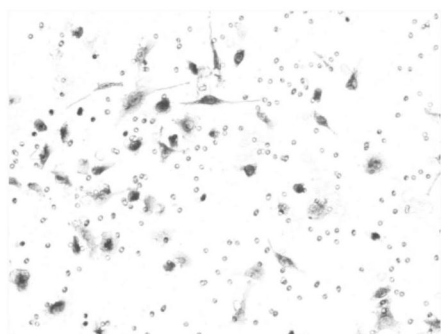
DHA: DDP =2: 8



DHA: DDP =3: 7

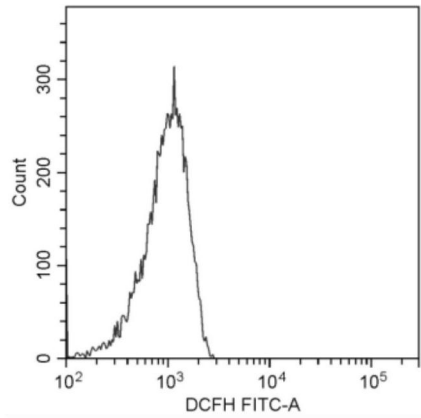


DHA: DDP = 4: 6

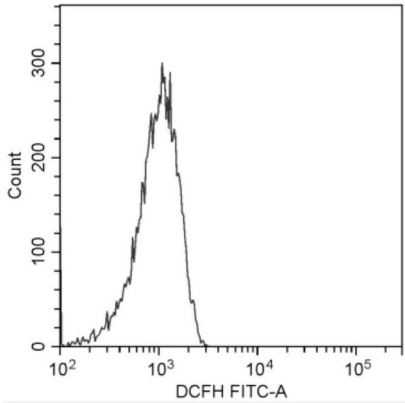


DHA: DDP =5: 5

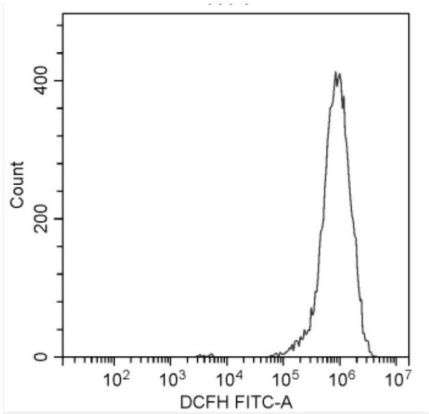
图9



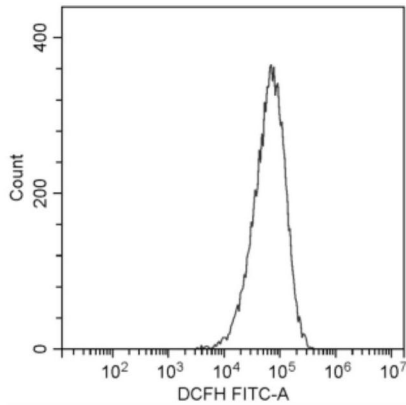
DHA: DDP =1: 9



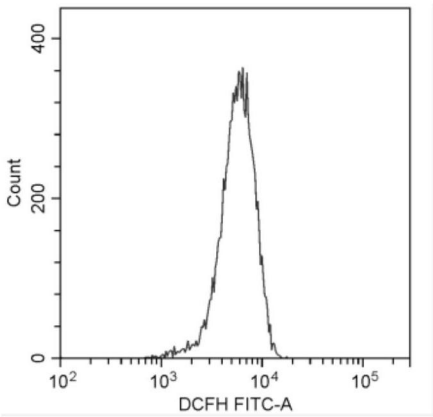
DHA: DDP =2: 8



DHA: DDP =3: 7



DHA: DDP =4: 6



DHA: DDP =5: 5

图10