



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114404398 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 29

(21) 申请号 202210104377.6

(22) 申请日 2022.01.28

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72) 发明人 蔡车国 余丽娅

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 江慧

(51) Int. Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

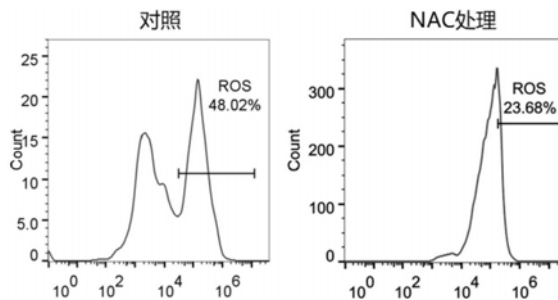
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。本发明通过研究中发现,与正常的乳腺细胞相比,乳腺癌细胞中的ROS水平显著性较高,而肿瘤细胞中的乳腺干细胞中又含有更高的ROS。而采用NAC抑制ROS干预可以显著性抑制乳腺癌细胞内的ROS水平,显著抑制TNBC异种移植肿瘤的生长和发展,证明了NAC的一种新的临床应用:治疗三阴性乳腺癌。



1. ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的药物,其特征在于,所述用于治疗三阴性乳腺癌的药物为抑制三阴性乳腺癌的发生和发展的药物。
3. 一种ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。
4. 一种用于治疗三阴性乳腺癌的药物,其特征在于,所述药物包括ROS抑制剂NAC。

ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,特别涉及ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。

背景技术

[0002] 2020年乳腺癌成为全球发病率最高的癌症,并且在2020年一年内约68.7万人死于乳腺癌。乳腺癌的治疗在90年代以前进行手术切除的比例很高,但大范围的进行手术治疗,给患者带来了许多心理和生理的负担。因此,在保乳的前提下对患者提供治疗是目前发展的趋势,当然这也对乳腺癌的治疗药物和治疗策略提出了更大的挑战。三阴性乳腺癌占乳腺癌病例的15-20%,通常与疾病复发的高风险和患者低生存率相关。三阴性乳腺癌是一种困难而复杂的疾病,在生物学、预后和治疗反应方面是异质的,即使在疾病的早期阶段被诊断出来,其临床治疗结果也并不令人满意。由于缺乏临床可用的特异性靶向药,目前三阴性乳腺癌的治疗只能采用化疗以及添加佐剂的新辅助治疗手段。因此,寻找三阴性乳腺癌的治疗靶点及靶向药物是目前乳腺癌研究领域的主要挑战。

[0003] 表型和功能的异质性是癌细胞最典型的特征之一,也是治疗失败的主要原因。研究已经证明肿瘤中存在驱动肿瘤生长和复发的细胞亚群,称为癌症干细胞(CSCs)。CSCs是肿瘤异质性的根本原因,因为它们能够产生所有的癌细胞类型。此外,CSCs也是肿瘤转移和治疗抵抗的主要驱动因素,许多癌症疗法虽然可以杀死大量肿瘤细胞,但最终可能失败,主要原因是它们不能消除CSCs。CSCs可以存活下来再生新的肿瘤并且转移至其它器官,因此靶向CSCs被认为是提高癌症治疗效率的有用策略。研究证明与分化的肿瘤细胞相比,CSCs具有独特的代谢特征,针对癌症干细胞的特殊代谢特征进行干预治疗,有望起到预防癌症的进展和复发的作用,并且进一步有望彻底治愈癌症。另外,老药新用的策略近些年也成为药物研发的重要方向,这种策略可以扩展现有化合物的药理和生物学特性,缩短药物研发的流程。

[0004] 因此,亟需开发用于治疗三阴性乳腺癌的药物。

发明内容

[0005] 本发明目的是提供ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用,本发明经过试验发现在TNBC肿瘤异种移植模型中,NAC靶向ROS可以抑制TNBC肿瘤的发生、发展。

[0006] 在本发明的第一方面,提供了ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。

[0007] 进一步地,所述用于治疗三阴性乳腺癌的药物为抑制三阴性乳腺癌的发生和发展的药物。

[0008] 在本发明的第二方面,提供了ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。

[0009] 在本发明的第三方面,提供了一种用于治疗三阴性乳腺癌的药物,所述药物包括ROS抑制剂NAC。

[0010] 所述药物还包括药学上可接受的辅料和载体。所述辅料包括填充剂、崩解剂、粘合剂、赋形剂、稀释剂、润滑剂、甜味剂或着色剂中的至少一种。所述药物的剂型包括颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂或分散剂中的至少一种。

[0011] 本发明实施例中的一个或多个技术方案,至少具有如下技术效果或优点:

[0012] 本发明提供ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用,本发明通过研究中发现,与正常的乳腺细胞相比,乳腺癌细胞中的ROS水平显著性较高,而肿瘤细胞中的乳腺干细胞中又含有更高的ROS。而采用NAC抑制ROS干预可以显著性抑制乳腺癌细胞内的ROS水平,显著抑制TNBC异种移植肿瘤的生长和发展,证明了NAC的一种新的临床应用:治疗三阴性乳腺癌。

附图说明

[0013] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0014] 图1为分析正常乳腺细胞,乳腺癌肿瘤细胞和乳腺癌干细胞内的ROS水平,即乳腺癌肿瘤细胞中ROS水平显著高于正常乳腺细胞,乳腺癌干细胞中ROS水平显著高于乳腺癌肿瘤细胞;

[0015] 图2为采用抑制ROS干预可以显著抑制乳腺癌肿瘤细胞中的ROS水平;

[0016] 图3为采用抑制ROS干预可以显著抑制TNBC异种移植肿瘤的生长和发展。

具体实施方式

[0017] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0018] 在整个说明书中,除非另有特别说明,本文使用的术语应理解为如本领域中通常所使用的含义。因此,除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的一般理解相同的含义。若存在矛盾,本说明书优先。

[0019] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等,均可通过市场购买获得或者可通过现有方法获得。

[0020] 本申请实施例的技术方案为解决上述技术问题,总体思路如下:

[0021] 第一部分是从小鼠正常乳腺细胞,乳腺癌细胞和乳腺癌干细胞从小鼠体内分选出,并且体外运用流式分析法检测细胞内ROS水平。

[0022] 第二部分是在TNBC肿瘤异种移植模型中,发现ROS抑制剂NAC可以显著抑制TNBC肿瘤的生长和发展。

[0023] NAC即N-acetyl-L-cysteine,也称LNAC,中文名为N-乙酰半胱氨酸,是一种常用的抗氧化剂。NAC为接近白色的粉末,分子量163.19,分子式为 $C_3H_9NO_3S$,纯度大于99%。溶解于

水,加热后在水中的溶解度可以达到100mg/ml。本发明实施例的NAC可购买于商业公司,例如碧云天,产品编号:S0077。

[0024] 下面将结合实施例及实验数据对本申请的ROS抑制剂NAC在制备用于治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用进行详细说明。

[0025] 实施例1、将小鼠正常乳腺细胞,乳腺癌细胞和乳腺癌干细胞从小鼠体内分选出,并且体外运用流式分析法分析细胞内ROS水平

[0026] 1、流式分选细胞

[0027] 取小鼠正常乳腺组织和MMTV-Wnt1自发肿瘤组织,将组织剪碎后加入到消化液中放置于100rpm摇床中消化2小时,期间每15分钟,手动晃动组织,以使组织更好的消化。组织消化完成后,用PBS重悬至50ml,然后1000rpm,4℃离心5min。弃上清,没管加入3ml红细胞裂解液,室温放置5min。将细胞转移至15ml离心管,并用PBS重悬,1000rpm,4℃离心5min。弃上清,加入pre-warmed 0.05%胰酶,37℃,5min,期间手动晃动细胞一次。接着加入3ml pre-warmed无血清的DMEM培养基,没管再加入60ul的DNA酶I,37℃,5min,期间手动晃动细胞一次。然后没管加入5%FBS/PBS至14ml以终止胰酶消化。接着将细胞用70um的筛子过滤,1000rpm,4℃离心5min,弃上清,用5%FBS/PBS重悬后加入抗体,放置冰上避光孵育20min,期间每隔5min混匀一下,以使细胞与抗体充分接触。孵育完成后,用PBS洗涤细胞,1000rpm,4℃离心5min,弃上清,用5%FBS/PBS重悬后,运用细胞表面Marker通过流式细胞仪分选出正常乳腺细胞,乳腺癌肿瘤细胞和乳腺癌干细胞。

[0028] 2、检测细胞内的ROS水平

[0029] DCFH-DA是一种可以自由穿过细胞膜的荧光探针,自身没有荧光进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH。在活性氧存在时DCFH被氧化为不能透过细胞膜的强绿色荧光物质DCF,然后可以用流式细胞仪检测细胞内的绿色荧光强度,并且荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。

[0030] 分选出正常乳腺细胞,乳腺癌肿瘤细胞和乳腺癌干细胞后,1000rpm离心5min收集细胞,没管加入500ul,10umol/L的DCFH-DA重悬细胞,在37℃,避光孵育30min,每隔5min混匀一下,使探针和细胞充分接触。孵育结束后用PBS TOP后1000rpm离心5min收集细胞,再用PBS洗涤1~2次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。将收集好的细胞沉淀用PBS重悬后,用流式细胞仪检测不同组细胞内的绿色荧光强度,绿色荧光强度则代表细胞内的ROS水平。

[0031] 分析正常乳腺细胞,乳腺癌肿瘤细胞和乳腺癌干细胞内的ROS水平的结果如图1所示,由图1可知,乳腺癌肿瘤细胞中ROS水平显著高于正常乳腺细胞,乳腺癌干细胞中ROS水平显著高于乳腺癌肿瘤细胞。

[0032] 实施例2、考察ROS抑制剂NAC对三阴性乳腺肿瘤生长和发展的抑制作用

[0033] 1、TNBC肿瘤细胞系的原位移植成瘤

[0034] 乳腺肿瘤细胞用50%FBS (PBS稀释) 重悬,以1:1的体积比加入Matrigel,再加入0.04%的台盼蓝,混匀后置于冰上直至接种小鼠。将小鼠麻醉后,将其腹部朝上置于实验台上,沿中线和两侧下肢的方向用剪刀将其腹部表皮剪出“Y”型开口(勿剪开腹膜)。用棉签和镊子向两侧剥离,暴露出第4对乳腺脂肪垫并用针头固定表皮。用注射器吸取10-20μL细胞悬液并注入乳腺脂肪垫内,最后合拢两侧皮肤并用手术钉进行缝合,待伤口愈合后可拆除手术钉。自手术起,每天观察记录小鼠肿瘤的发生情况。约一周左右,用游标卡尺测量并记

录肿瘤的长宽并监测小鼠体重的变化。肿瘤体积通过以下公式计算：体积(mm³) = 长 × 宽 × 宽 × 0.52。

[0035] 2、NAC抑制TNBC肿瘤的生长

[0036] 同实施例2中肿瘤细胞系原位移植操作，待肿瘤大小长至50-100cm³，将小鼠分为对照组(溶剂)、NAC给药组(300mg/kg)，每组3只，隔天腹腔注射12天，中间每天称量小鼠体重，每两天测量肿瘤大小，12天后处死小鼠称量肿瘤重量。

[0037] 3、NAC抑制肿瘤细胞内的ROS水平

[0038] 将对照组或者是NAC处理组各取一些肿瘤组织消化成单细胞后分选mCherry+的肿瘤细胞，然后同实施例1中检测细胞内的ROS水平去检测两组肿瘤细胞内的ROS水平。

[0039] 结果如图2-图3所示；

[0040] 由图2可知，采用抑制ROS干预可以显著抑制乳腺癌肿瘤细胞中的ROS水平；

[0041] 由图3可知，采用抑制ROS干预可以显著抑制TNBC异种移植肿瘤的生长和发展。

[0042] 最后，还需要说明的是，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0043] 尽管已描述了本发明的优选实施例，但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念，则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以，所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0044] 显然，本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样，倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内，则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

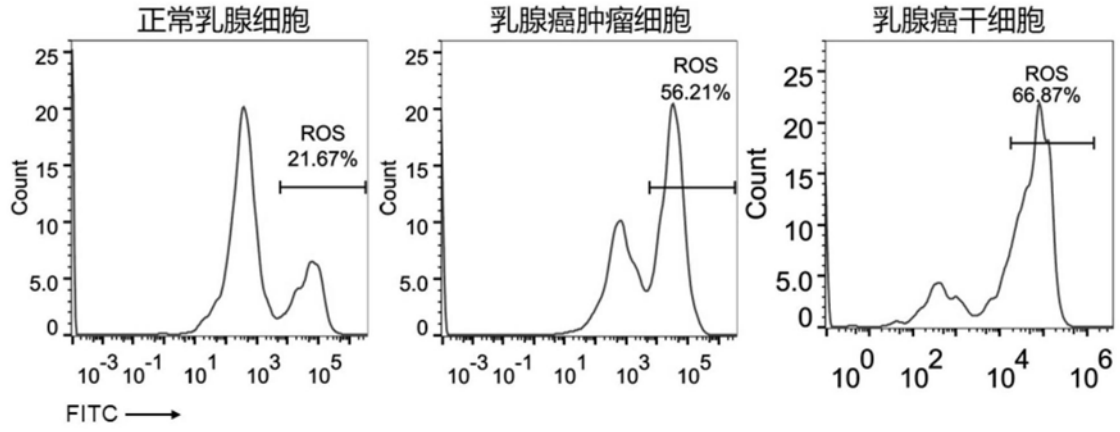


图1

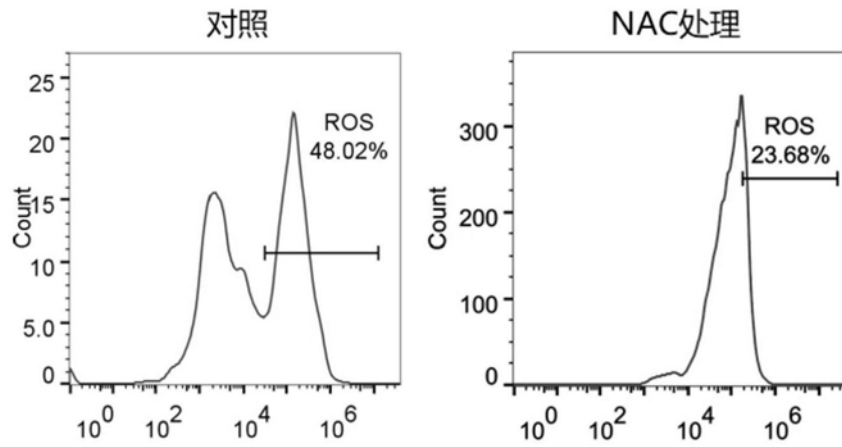


图2

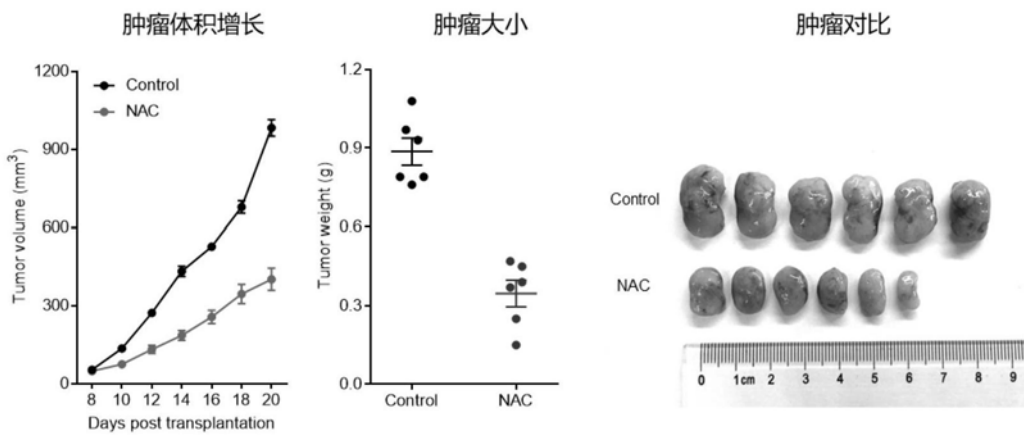


图3