



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112675164 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(21) 申请号 202110048887.1

A61K 131/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.14

(71) 申请人 大连大学

地址 116622 辽宁省大连市经济技术开发区  
学府大街10号

(72) 发明人 梁珊珊 王漂 王若雨

(74) 专利代理机构 大连智高专利事务所(特殊  
普通合伙) 21235

代理人 胡景波

(51) Int. Cl.

A61K 31/36 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 36/79 (2006.01)

A61K 36/57 (2006.01)

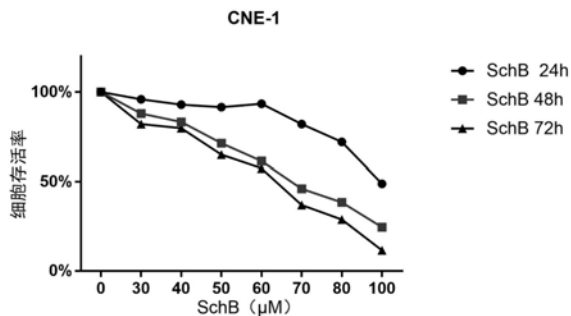
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用

(57) 摘要

五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用,属于抗癌药物领域。本发明中五味子乙素为药物型制剂,药物剂型为片剂、颗粒剂、胶囊剂、注射剂、缓释剂、靶向剂中的一种。本发明中提供五味子乙素对鼻咽癌的治疗应用,具备毒副作用小,治疗作用显著的优点。



1. 五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用,其特征在於,五味子乙素在抑制鼻咽癌细胞增殖方面的应用。
2. 根据权利要求1所述的五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用,其特征在於,五味子乙素在抑制鼻咽细胞克隆性生长和迁移能力方面的应用。
3. 一种权利要求1中五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂,其特征在於,五味子乙素药物型制剂为片剂、颗粒剂、胶囊剂、注射剂、缓释剂、靶向剂中的一种。

## 五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于抗癌药物领域,具体涉及五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用。

### 背景技术

[0002] 五味子是著名的滋补固涩类中药,主产于我国东北和华北地区。神农本草经中五味子列为上品,具有益气强阴、养五脏、名目壮筋骨等多种功效。

[0003] 五味子乙素(Schisandrin B)的化学式为 $C_{23}H_{28}O_6$ ,分子量为400.471g/mol,是从五味子果实中提取的二苯并环辛二烯衍生物。现代研究表明,五味子乙素是五味子的有效成分木脂素的主要活性物质之一。既往研究证实五味子乙素在动物实验中具有较好的安全性,同时在保护肝脏、心肌、神经系统及抗皮肤老化等方面具有功效。

[0004] 近年来研究发现,五味子乙素在抗肿瘤方面具有一定的作用,其抗肿瘤作用主要涉及如下机制:①逆转肿瘤的多药耐药、②抗肿瘤血管生成、③诱导肿瘤细胞凋亡、④抑制肿瘤的侵袭和转移。以上研究为五味子乙素在抗肿瘤方面的转化应用提供了理论基础。

[0005] 鼻咽癌是发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤,在我国南部(尤其是广东、广西两省)和东南亚地区高发,是耳鼻咽喉恶性肿瘤的主要癌种和致死因素。放射治疗是鼻咽癌的首选与主要治疗方法,对于晚期鼻咽癌,单纯放射治疗效果较差,而调强放射治疗加同步放化疗在增加疗效的同时会产生不良反应,且长期治疗后可能导致肿瘤细胞产生耐药性及反射抵抗性。

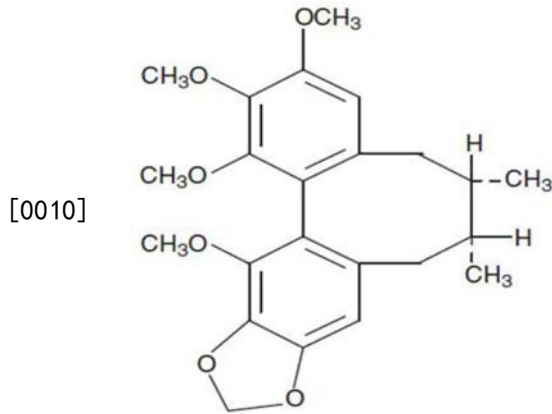
[0006] 因此,筛选对鼻咽癌有显著疗效而副反应较小、同时具有协同放化疗作用的天然抗肿瘤药物具有重要的转化价值与临床意义。

[0007] 目前已有报道五味子乙素在肝癌、乳腺癌、肝胆管癌、肺癌、神经胶质瘤和胃癌中具有抗肿瘤作用,主要通过逆转肿瘤的多药耐药、抗肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤的侵袭和转移等不同的机制发挥抗肿瘤作用。但五味子乙素对鼻咽癌细胞的作用尚无报道。

### 发明内容

[0008] 针对上述不足本发明提供五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用,五味子乙素安全性高,具有较小毒性,有良好的临床应用前景。

[0009] 本发明提供五味子乙素在抑制鼻咽癌增殖和转移方面的应用。五味子乙素化学结构式如下:



[0011] 进一步的,五味子乙素药物剂型为片剂、颗粒剂、胶囊剂、注射剂、缓释剂、靶向剂中的一种。

[0012] 有益效果:本发明中提供五味子乙素抑制鼻咽癌细胞药物型制剂的应用,具备毒副作用小,治疗作用显著的优点。

### 附图说明

[0013] 图1为五味子乙素抑制咽癌细胞增殖的时间-浓度-效果图。

[0014] 图2为不同浓度五味子乙素对鼻咽癌细胞S期细胞阻滞的流式分析图。

[0015] 图3为不同浓度五味子乙素对鼻咽癌细胞S期阻滞的细胞分析统计柱状图。。

[0016] 图4为不同浓度五味子乙素抑制鼻咽癌细胞克隆形成能力的平板克隆图。

[0017] 图5为不同浓度五味子乙素抑制鼻咽癌细胞克隆形成率的统计柱状图。

[0018] 图6为不同浓度五味子乙素抑制鼻咽癌细胞迁移能力的划痕实验图。

[0019] 图7为30 $\mu$ m五味子乙素抑制鼻咽癌细胞迁移能力的统计柱状图。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0021] 实施例1:五味子乙素抑制鼻咽癌细胞增殖实验

[0022] (1) 实验材料

[0023] ①实验试剂:

[0024] 五味子乙素(SchB)(纯度>95%, selleck.cn, 美国)、DMSO(sigma、英国)、RPMI-1640培养基(Gibco, 美国)、0.25%1 $\times$ 胰蛋白酶/EDTA(Hyclone, 美国)、优级胎牛血清(Gibco, 美国)、D-PBS(生工, 上海, 中国)、Penicillin-Streptomycin双抗(Hyclone, 美国)、CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒(DOJINDO, 日本)、PI/RNase染色缓冲液(BD, 美国)、4%多聚甲醛(索莱宝, 北京, 中国)、1%结晶紫染色液(索莱宝, 北京, 中国)、100%乙醇(康泰, 中国)。

[0025] ②实验耗材:

[0026] 培养皿(100mm、60mm):Corning Costar, 美国;细胞培养板(96孔、12孔、6孔)、离心管(50ml、15ml、1.5ml、500 $\mu$ l、200 $\mu$ l)、吸头等一次性耗材:生工, 上海, 中国。

[0027] ③实验仪器:

[0028] 二氧化碳培养箱(MEMMERT INC0108, 德国)、超净工作台(HDL DL-CJ-2ND I, 北京,

中国)、倒置显微镜(Leica Dmirb,德国)、NIB410-FL荧光显微镜(Nexcope,中国)、台式冷冻离心机(Eppendorf,德国)、多功能酶标仪(Biotek synergy2,美国)、流式细胞仪(BD,美国)、纯水/超纯水系统(Merck Millipore,德国)。

[0029] ④实验细胞:

[0030] 人鼻咽癌CNE-1细胞株(广州中山大学赠予)

[0031] (2)实验方法

[0032] ①细胞培养:

[0033] 人鼻咽癌CNE-1细胞,常规培养于含10%FBS、1%Penicillin-Streptomycin双抗的RPMI-1640培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。实验中所有细胞均用对数生长期细胞。

[0034] ②五味子乙素处理:

[0035] 五味子乙素用二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度为100mM的储备液,然后用RPMI-1640培养基稀释成工作液,DMSO终浓度≤0.4%。

[0036] ③CCK-8细胞增殖-毒性检测:

[0037] 取处于对数生长期状态良好的CNE-1细胞接种于96孔板(3块),设浓度为1000个/孔,每组设置5个复孔,放入培养箱培养18h,然后按实验计划给予五味子乙素(0、30、40、50、60、70、80、100μM)处理后置于培养箱中继续培养。分别于24h、48h、72h小时终止培养,每孔加入10μlCCK-8试剂,置于培养箱培养2h。多功能酶标仪测定各孔450nm波长的吸光值A值,细胞存活率(%) =  $(A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$ 。

[0038] 重复实验三次。

[0039] ④细胞周期实验:

[0040] 取处于对数生长期状态良好的CNE-1细胞接种于10cm培养皿,设浓度为 $2.5 \times 10^5$ 个/皿,放入培养箱培养18h,然后按实验计划给予SchB(30、60、80μM)处理后置于培养箱培养。于48h后终止培养收集细胞,800r/s离心5min,弃去培养液,PBS洗涤1遍,离心弃PBS,加入预冷的70%冰乙醇,于-20℃下固定过夜,离心弃固定液,冰PBS洗涤2遍,计数后取 $1 \times 10^6$ 个细胞于离心管,离心弃PBS,加入500μl PI/RNase染色缓冲液悬浮细胞,室温下避光孵育15min。流式细胞仪检测,观察细胞周期不同时相的细胞数。数据使用ModFit LT软件分析。

[0041] ⑤细胞克隆形成实验:

[0042] 取处于对数生长期状态良好的CNE-1细胞接种于6孔板,设浓度为200个/孔,放入培养箱中培养,18小时后加入SchB(30、60、80μM)处理,继续放培养箱培养,每3天换一次液,1周后终止培养,弃培养液,PBS洗涤2遍,4%多聚甲醛固定15min,弃固定液,PBS洗2遍,加0.1%结晶紫溶液室温下染色30min,弃染色液,PBS清洗3遍,自然干燥。细胞使用NIB410-FL荧光显微镜(Nexcope,中国)拍照,克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

[0043] (3)实验结果

[0044] 五味子乙素可以显著抑制鼻咽癌细胞增殖:

[0045] 如图1所示,五味子乙素明显抑制鼻咽癌细胞增殖能力,且呈剂量和时间依赖性,其中作用48h效率最高。图2、3进一步证实,五味子乙素通过阻滞细胞周期抑制鼻咽癌细胞增殖。图4、5更进一步证实五味子乙素通过抑制鼻咽癌单细胞增殖能力显著抑制鼻咽癌细胞增殖。

[0046] 实施例2:五味子乙素抑制鼻咽癌细胞转移实验

[0047] (1) 实验材料

[0048] ①实验试剂:

[0049] 五味子乙素 (SchB) (纯度>95%, selleck.cn, 美国)、DMSO (sigma、英国)、RPMI-1640培养基 (Gibco, 美国)、0.25% 1×胰蛋白酶/EDTA (Hyclone, 美国)、优级胎牛血清 (Gibco, 美国)、D-PBS (生工, 上海, 中国)、Penicillin-Streptomycin双抗 (Hyclone, 美国)。

[0050] ②实验耗材:

[0051] 直尺, 其它同上。

[0052] ③实验细胞:

[0053] 同上。

[0054] ④实验仪器:

[0055] 二氧化碳培养箱 (MEMMERT INC0108, 德国)、超净工作台 (HDL DL-CJ-2ND I, 北京, 中国)、倒置显微镜 (Leica Dmirb, 德国)、NIB410-FL荧光显微镜 (Nexcope, 中国)、台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国)。

[0056] (2) 实验方法

[0057] ①细胞培养:

[0058] 同上。

[0059] ②五味子乙素处理:

[0060] 同上。

[0061] ③划痕实验:

[0062] 取处于对数生长期状态良好的CNE-1细胞接种于6孔板,  $3.5 \times 10^5$ 个/孔, 置于培养箱中培养18h, 细胞铺板达90%以上后, 以200 $\mu$ l枪头沿直尺垂直于孔底划痕, 每孔2道, 用D-PBS洗涤2遍, 按实验计划加入无血清RPMI-1640培养基稀释的SchB (30、60、80 $\mu$ M) 处理后继续置于培养箱培养。分别于0h、24h、48h使用NIB410-FL荧光显微镜观察并拍照, 使用ImageJ180软件分析计算迁移率。

[0063] (3) 实验结果

[0064] 抑制鼻咽癌细胞转移:

[0065] 如图6、7所示, 五味子乙素显著抑制鼻咽癌细胞迁移能力, 且呈剂量依赖性。中浓度组 (60 $\mu$ M) 和高浓度组 (80 $\mu$ M) 由于杀伤细胞数目多, 导致数据无法分析。

[0066] 上述实施例只是用于对本发明的举例和说明, 而非意在将本发明限制于所描述的实施例范围内。此外本领域技术人员可以理解的是, 本发明不局限于上述实施例, 根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改, 这些变型和修改均落在本发明所要求保护的范围内。

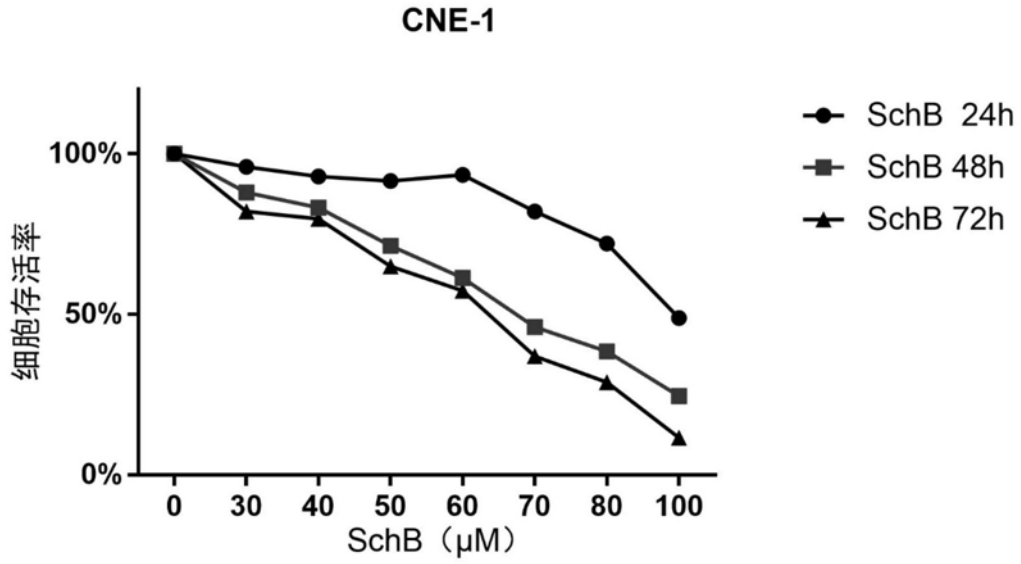


图1

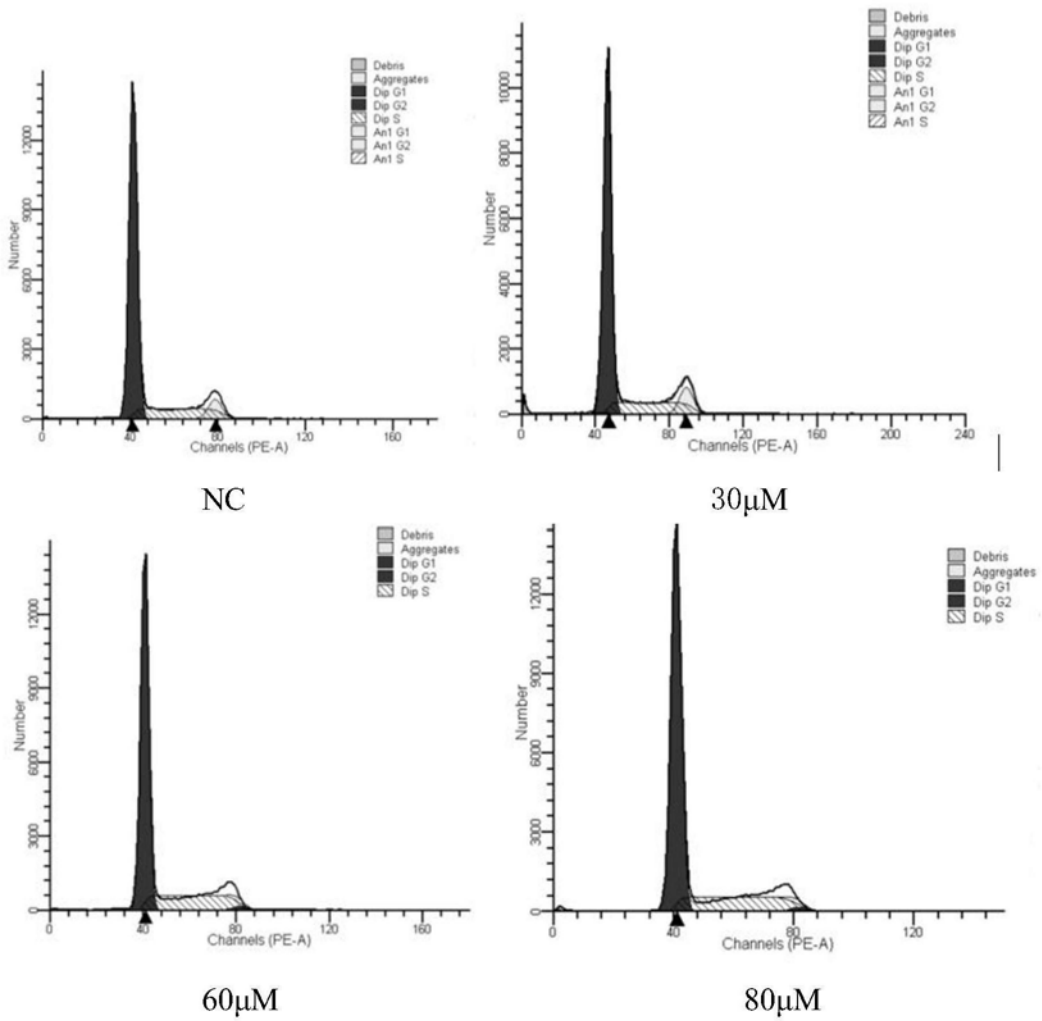


图2

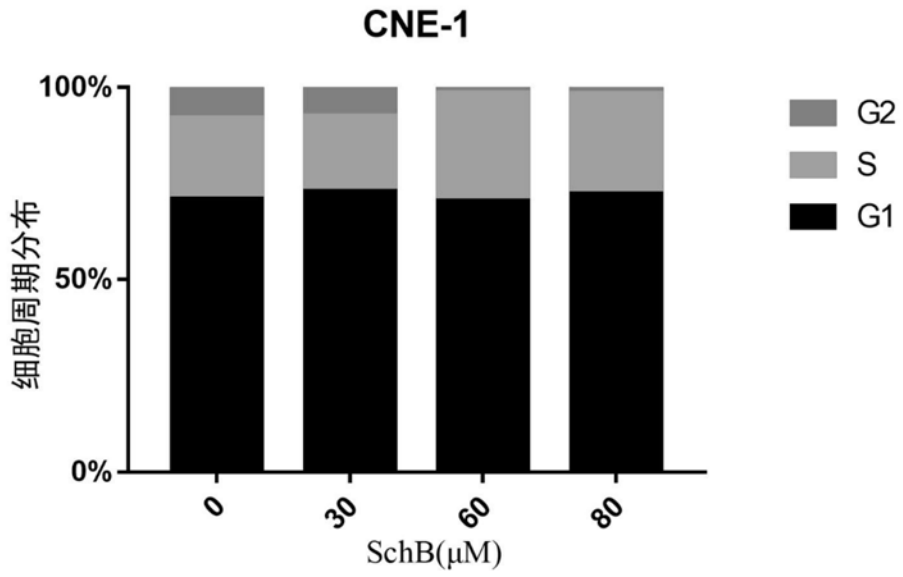


图3

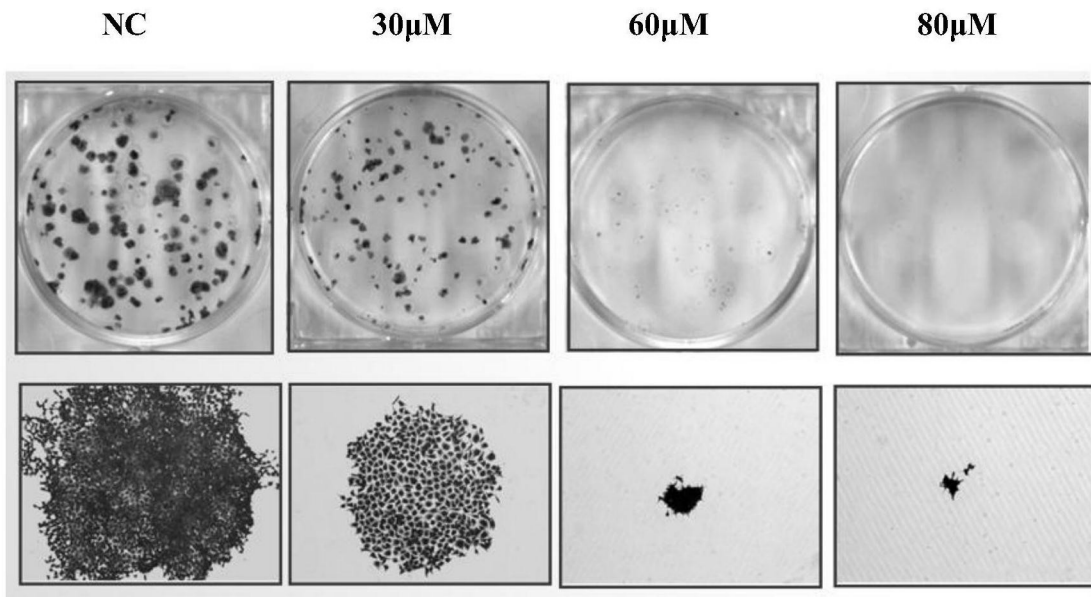


图4



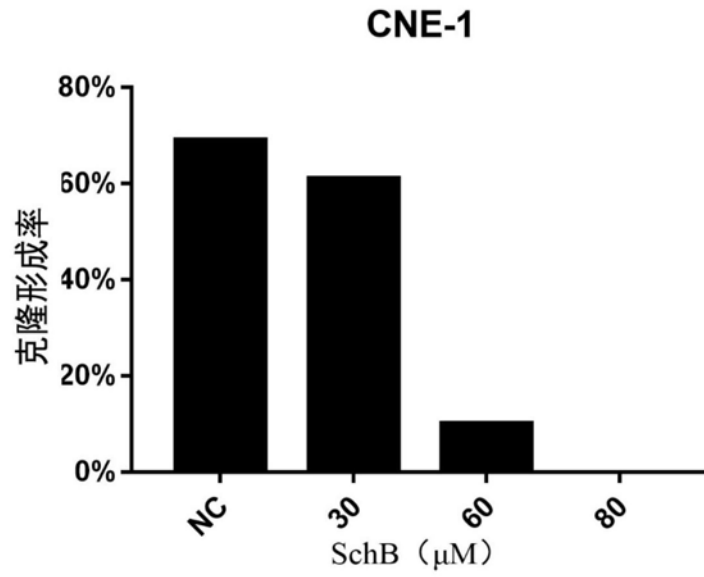


图5

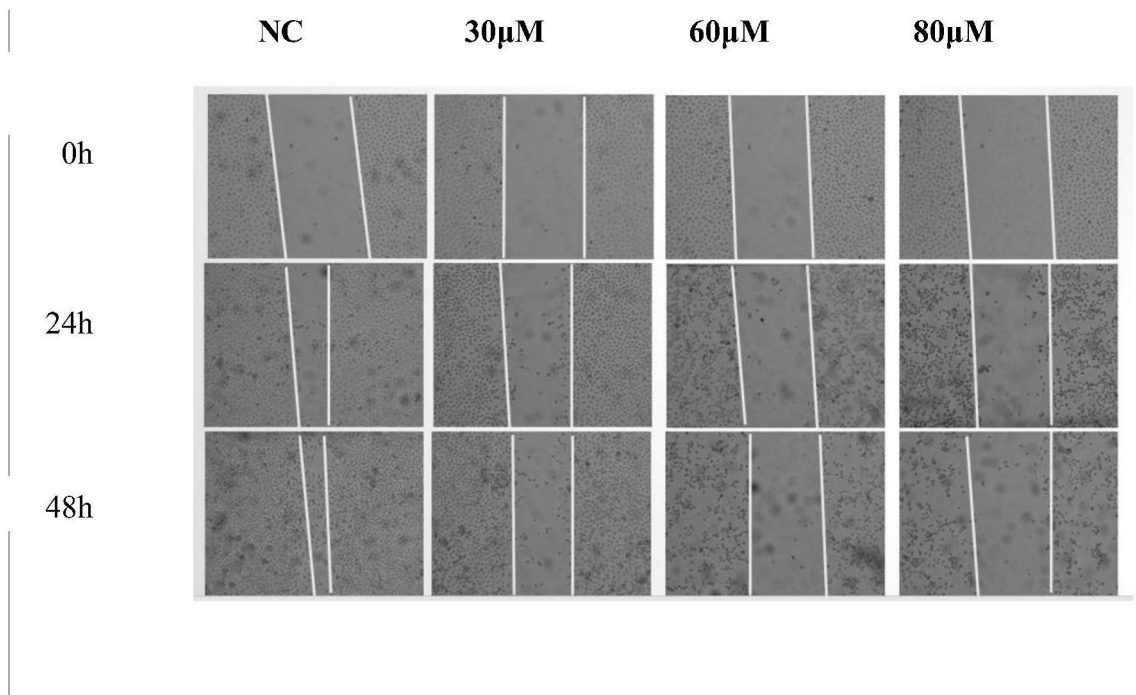


图6

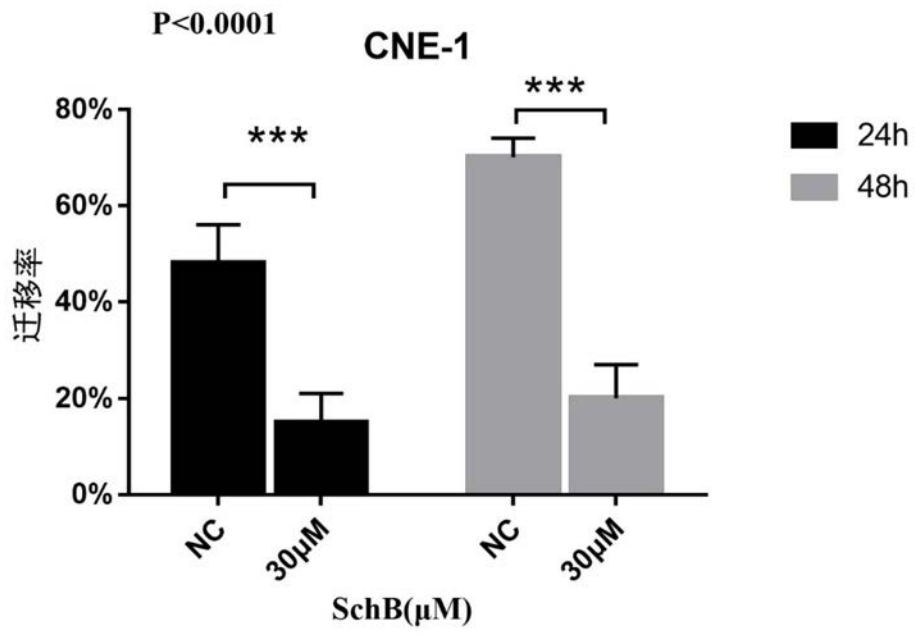


图7