



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102836149 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 26

(21) 申请号 201110168962. 4

(22) 申请日 2011. 06. 22

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市海淀区大屯路 15 号

(72) 发明人 杨真威

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006. 01)

A61K 31/05 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A23L 1/30 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物及其应用。该组合物由槲皮素和白藜芦醇组成；其中，槲皮素和白藜芦醇的摩尔比为与单用槲皮素和白藜芦醇各自的半效浓度 (EC50) 的比值相关。本发明组合物可用于制备下述任意一种产品：1) 真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂；2) 预防和 / 或治疗肿瘤的药物；3) 保健品；4) 食品；5) 营养素补充剂。试验表明，该组合物抗肿瘤增殖作用相比于单一槲皮素和白藜芦醇显著增强。联合指数  $CI < 1$ ，表明二者之间有协同作用。在达到相同效果时，组合物中单成分使用浓度降低，即意味着降低对宿主正常细胞可能存在的潜在毒性。

1. 一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物,由槲皮素和白藜芦醇组成。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于:所述槲皮素和白藜芦醇的摩尔比为两者单独使用时各自对肿瘤细胞的半数有效浓度 EC50 的比值。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于:所述癌细胞为乳腺癌细胞,优选人乳腺癌细胞 MCF-7 或 MDA-MB-231 ;所述组合物中的槲皮素和白藜芦醇的摩尔比为 1 : (2-9),优选摩尔比为 1 : (3-7)。
4. 权利要求1-3中任一项所述的组合物在制备下述产品中的应用:1) 真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂;2) 预防和 / 或治疗肿瘤的药物;3) 保健品;4) 食品;5) 营养素补充剂。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述真核生物为人或哺乳动物,所述肿瘤细胞为癌细胞,所述癌细胞为乳腺癌细胞,优选人乳腺癌细胞 MCF-7 或 MDA-MB-231 ;所述肿瘤为癌,所述癌为乳腺癌。
6. 一种真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂,其活性成分为权利要求1-3中任一项所述的组合物。
7. 根据权利要求6所述的肿瘤细胞增殖抑制剂,其特征在于:所述肿瘤细胞为癌细胞,所述癌细胞为乳腺癌细胞,优选人乳腺癌细胞 MCF-7 或 MDA-MB-231。
8. 一种预防和 / 或治疗肿瘤的药物或保健品,其活性成分为权利要求1-3中任一项所述的组合物。
9. 根据权利要求8所述的药物或保健品,其特征在于:所述真核生物为人或哺乳动物,所述药物或保健品中所述活性成分的质量含量为 0.01-10%,优选 2-5%。
10. 根据权利要求8或9所述的药物或保健品,其特征在于:所述药物或保健品中还包  
括药学上可接受的载体;所述药物的剂型为注射制剂或口服制剂,优选注射制剂,尤其是静脉注射制剂。

## 一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是女性多发肿瘤之一,治疗手段之一是通过饮食调节。大约 25 个世纪以前,医学之父希波克拉底就说过“食品即药品,药品即食品”,已经揭示了饮食和健康之间的密切关系。据目前我们所知,可以通过饮食调节来预防 35% 的癌症。现代研究表明,天然蔬菜水果中的植物素可以起到抑制肿瘤细胞增殖的作用,同时实验数据证明蔬菜水果的抗增殖作用要强于单一的植物素。分析原因,植物素之间可能存在的协同或叠加作用可以解释为什么单一植物素通常不能代替整个食物的作用。协同治疗作用是指两种或以上化合物联合使用与相同浓度下单一使用相比获得更强的作用。化合物之间的这种协同作用在临床领域具有重大意义,其意味着在达到相同效果的前提下,降低单一化合物的用量,也即意味着降低单一化合物可能存在的对宿主细胞的毒性。因此探索天然植物素之间的协同作用可以为临床治疗某些疾病提供新的思路。

[0003] 黄酮类化合物是一类广泛存在于水果蔬菜中的成分,早在其被分离出之前人们就已经知道这类化合物的功效。黄酮类化合物具有抗氧化、抗心血管疾病、保肝护肝等方面的作用。槲皮素和白藜芦醇均属于黄酮类化合物。槲皮素主要存在于绿茶、洋葱、苹果中,具有抗心血管疾病、抗氧化、抗凋亡作用,同时具有逆转多药耐药性的潜力。白藜芦醇主要存在于红葡萄酒和红酒中,具有抗心血管疾病、抗氧化、抗凋亡作用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种抑制肿瘤细胞增殖的组合物及其应用。

[0005] 本发明所提供的抑制肿瘤细胞增殖的组合物,由槲皮素和白藜芦醇组成。

[0006] 其中,所述槲皮素和白藜芦醇的摩尔比为两者单独使用时各自对肿瘤细胞的半数有效浓度 EC<sub>50</sub> 的比值。

[0007] 以乳腺癌细胞为例,组合物中的槲皮素和白藜芦醇的摩尔比为 1 : (2-9),优选摩尔比为 1 : (3-7)。

[0008] 本发明所提供的组合物的应用主要是在制备下述产品中的应用:1) 真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂;2) 预防和/或治疗肿瘤的药物;3) 保健品;4) 食品;5) 营养素补充剂。

[0009] 其中,所述真核生物为人或哺乳动物;所述肿瘤细胞为癌细胞,所述癌细胞优选为乳腺癌细胞,如人乳腺癌细胞 MCF-7 或 MDA-MB-231。

[0010] 所述肿瘤为癌,所述癌优选为乳腺癌。

[0011] 本发明组合物也可用作某些食品或药物的添加剂或营养补充剂加入到产品中,例如饼干、糖果、饮料、粥等普通食品,保健食品,特殊营养食品,营养素补充剂,药品等。

[0012] 本发明的再一个目的是提供一种真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂。

[0013] 本发明所提供的真核生物肿瘤细胞增殖抑制剂,其活性成分为本发明所述的槲皮

素和白藜芦醇组合物。

[0014] 所述真核生物为人或哺乳动物；所述肿瘤细胞为癌细胞，所述癌细胞优选为乳腺癌细胞，如人乳腺癌细胞 MCF-7 或 MDA-MB-231。

[0015] 本发明还提供了一种预防和 / 或治疗肿瘤的药物或保健品。

[0016] 本发明所提供的药物或保健品，其活性成分为本发明所述的槲皮素和白藜芦醇组合物。

[0017] 所述药物或保健品中所述活性成分的质量含量为 0.01-10%，优选 2-5%。

[0018] 需要的时候，在上述药物或保健品中还可以加入一种或多种药学上可接受的载体。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等，也可加入其它辅助剂如香味剂、甜味剂等。

[0019] 以槲皮素和白藜芦醇的组合物为活性成分制备的药物或保健品可以制成注射液、片剂、粉剂、颗粒剂、胶囊、口服液等多种形式，优选制成静脉注射剂。上述各种剂型的药物均可以按照药学领域的常规方法制备。

[0020] 本发明提供的槲皮素和白藜芦醇组合物的特点是在使用浓度内能抑制肿瘤细胞增殖但对肿瘤细胞没有毒性。由槲皮素和白藜芦醇组成的组合物，抗肿瘤增殖作用相比于单一槲皮素和白藜芦醇显著增强。联合指数  $CI < 1$ ，表明二者之间有协同作用。在达到相同效果时，组合物中单成分使用浓度降低，即意味着降低对宿主正常细胞可能存在的潜在毒性。

#### 附图说明

[0021] 图 1 为槲皮素、白藜芦醇和槲皮素白藜芦醇组合物对 MCF-7 的细胞毒性。

[0022] 图 2 为槲皮素、白藜芦醇和槲皮素白藜芦醇组合物抑制 MCF-7 细胞增殖作用；图中的 \* 表示  $P < 0.05$ ，\*\* 表示  $P < 0.01$ ，\*\*\* 表示  $P < 0.001$ ；槲皮素白藜芦醇组合物的浓度以其中槲皮素浓度表示。

#### 具体实施方式

[0023] 下面通过具体实施例对本发明进行说明，但本发明并不局限于此。

[0024] 下述实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和生物材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

[0025] 下述实施例中所用的乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。

[0026] 实施例 1 槲皮素和白藜芦醇对乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 的细胞毒性

[0027] 将 MCF-7 细胞以  $4 \times 10^4$ /孔的浓度接种 96 孔板，置于 5%  $CO_2$ /37℃ 培养箱孵育 24 小时。用系列浓度的槲皮素溶液 (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu M$ )、白藜芦醇溶液 (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200  $\mu M$ )、槲皮素和白藜芦醇组合物溶液 (0+0  $\mu M$ , 2.75+9.63  $\mu M$ , 5.50+19.25  $\mu M$ , 11.00+38.50  $\mu M$ , 16.50+57.75  $\mu M$ , 22.00+77.00  $\mu M$ , 27.50+96.25  $\mu M$ ) 或空白对照分别处理 24 小时。去除培养基，每孔加入 50  $\mu l$  亚甲基蓝染色固定 1 小时，去除染色液，在去离子水中浸洗几次，直至去离子水中不再显示蓝色。每孔加入 100  $\mu l$  洗脱液 (PBS+50%乙醇+1%冰醋酸)，室温摇床脱色 20 分钟，用 MRX Microplate Reader 在 570nm 读

取吸收光。每个样品的每个浓度均有 3 个重复。实验数据以平均数 ± 标准差 (X±SD) 表示。

[0028] 对于 MDA-MB-231 细胞系的实验方法与 MCF-7 相同。

[0029] 结果见图 1, 数据表明槲皮素、白藜芦醇以及槲皮素白藜芦醇组合物与空白对照相比在 MCF-7 和 MDA-MB-231 两个细胞系上各个检测浓度均没有细胞毒性。

[0030] 实施例 2 槲皮素和白藜芦醇组合物抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖

[0031] 将 MCF-7 细胞以  $2.5 \times 10^4$ /孔的浓度接种 96 孔板, 置于 5% CO<sub>2</sub>/37℃ 培养箱孵育 24 小时。用系列浓度的槲皮素 (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM)、白藜芦醇 (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200 μM)、槲皮素和白藜芦醇组合物 (0+0 μM, 2.75+9.63 μM, 5.50+19.25 μM, 11.00+38.50 μM, 16.50+57.75 μM, 22.00+77.00 μM, 27.50+96.25 μM) 或空白对照分别处理 72 小时。去除培养基, 每孔加入 50ul 亚甲基蓝溶液染色固定 1 小时, 去除染色液, 在去离子水中浸洗几次, 直至去离子水中不再显示蓝色。每孔加入 100ul 洗脱液 (PBS+50% 乙醇 +1% 冰醋酸), 室温摇床脱色 20 分钟, 用 MRX Microplate Reader 在 570nm 读取吸收光。每个样品的每个浓度均有 3 个重复。实验数据以平均数 ± 标准差 (X±SD) 表示, 采用 SPSS 软件进行方差分析, 进行显著性检验后, 再进行两两比较 t 检验。结果见图 2。

[0032] 实验结果表明槲皮素和白藜芦醇对 MCF-7 均有抑制增殖作用, 且二者的作用都是剂量依赖性的。根据二者的量效曲线求得二者的 EC<sub>50</sub> 分别是  $41.0 \pm 3.6 \mu\text{M}$  和  $147.7 \pm 4.7 \mu\text{M}$ 。依据  $0.0625 * \text{EC}_{50}$ 、 $0.125 * \text{EC}_{50}$ 、 $0.25 * \text{EC}_{50}$ 、 $0.375 * \text{EC}_{50}$ 、 $0.5 * \text{EC}_{50}$ 、 $0.625 * \text{EC}_{50}$  的原则确定二者组成组合物的浓度, 分别为 0+0 μM, 2.75+9.63 μM, 5.50+19.25 μM, 11.00+38.50 μM, 16.50+57.75 μM, 22.00+77.00 μM, 27.50+96.25 μM。利用联合指数 (CI) 分析药物之间的相互作用 (参考文献: (1)Chou, T-C. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: T, -C Chou and D. C. Rideout (Eds), Synergism and Antagonism in Chemotherapy, 1991, pp. 61-102, Academic Press, Orlando, FL. (2)Chou, T-C.; Motzer, R. J.; Tong, Y. Z.; Bosl, G. J. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. J. Natl. Cancer Inst. 1994, 86, 1517-1524.)。

$$[0033] \quad CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

[0034] 其中, (D)<sub>1</sub> 和 (D)<sub>2</sub> 是指槲皮素白藜芦醇联合使用使生长抑制率达 X 时组合物中槲皮素和白藜芦醇各自的浓度, (D<sub>x</sub>)<sub>1</sub>, (D<sub>x</sub>)<sub>2</sub> 是指槲皮素和白藜芦醇单独使用槲皮素和白藜芦醇各自的浓度。当 CI < 1, 表示二者有协同作用; CI = 1, 表示二者有相加作用; CI > 1, 表示两者有拮抗作用。

[0035] DRI 指数表示达到同等效果时, 合用剂量比单独使用剂量减少的指数。降低剂量即意味着降低对宿主的毒性, 所以 DRI 指数在临床上意义非常重大。

[0036] 槲皮素和白藜芦醇组合物以剂量依赖方式抑制 MCF-7 增殖。根据剂量依赖曲线求得组合物中槲皮素和白藜芦醇的 EC<sub>50</sub> 分别是  $9.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$  和  $68.2 \pm 3.8 \mu\text{M}$ , 与单一化合物相比分别降低了 3.1 和 1.2 倍。根据槲皮素、白藜芦醇和槲皮素白藜芦醇组合物三者的抑

制 MCF-7 量效关系曲线计算出槲皮素、白藜芦醇的联合指数 (CI), 且  $CI < 1$ , 表示槲皮素和白藜芦醇之间有协同作用。根据上述参考文献, 计算 DRI 指数, 数据见表 3, 表明槲皮素白藜芦醇组合物的使用剂量与单个槲皮素和白藜芦醇的使用剂量相比, 在各个抑制率都有明显降低。

[0037] 对于 MDA-MB-231 细胞系的实验方法 MCF-7 相同, 结果相似。

[0038] 表 1、槲皮素、白藜芦醇及其组合物对 MCF-7 的 EC50

		EC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	组分	单独使用	联合使用
[0039]	槲皮素	41.0 $\pm$ 3.6	9.9 $\pm$ 0.6
	白藜芦醇	147.7 $\pm$ 4.7	68.2 $\pm$ 3.8

[0040] 表 2、槲皮素、白藜芦醇及其组合物对 MDA-MB-231 的 EC50

		EC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	组分	单独使用	联合使用
[0041]	槲皮素	26.3 $\pm$ 1.9	12.2 $\pm$ 0.6
	白藜芦醇	148.9 $\pm$ 2.9	61.4 $\pm$ 2.8

[0042] 表 3 槲皮素和白藜芦醇组合物对 MCF-7 的 CI 值、DRI 值

[0043]

抑制率	CI 值	DRI 值	
		槲皮素	白藜芦醇
10%	0.43 $\pm$ 0.11	4.03 $\pm$ 2.72	3.61 $\pm$ 0.95
50%	0.80 $\pm$ 0.10	2.54 $\pm$ 0.62	2.29 $\pm$ 0.20
70%	0.90 $\pm$ 0.02	2.36 $\pm$ 0.17	2.05 $\pm$ 0.06
90%	0.96 $\pm$ 0.12	2.20 $\pm$ 0.43	1.75 $\pm$ 0.34

[0044] 实施例 3、槲皮素和白藜芦醇组合物对小鼠移植瘤生长的影响

[0045] 健康雌性 TA2 小鼠, 5 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 22g。购买移植 MCF7 肿瘤细胞的小鼠, 处死荷瘤小鼠, 无菌操作下取瘤块边缘无坏死组织部分切成 2mm×2mm×2mm 大小瘤块 (约含  $2 \times 10^6$  个瘤细胞) 移植于健康小鼠右侧腹股沟皮下。将上述荷瘤小鼠随机分为 4 组, 每组 8 只, 1 组为对照组, 另三组分别给药槲皮素、白藜芦醇、槲皮素白藜芦醇组合物。给药浓度为槲皮素 100  $\mu$ M, 白藜芦醇 200  $\mu$ M, 槲皮素白藜芦醇组合物 27.50+96.25  $\mu$ M。给药方式为静脉注射。检测指标为瘤重及体重的测定。实验数据以平均数  $\pm$  标准差 ( $X \pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS 软件进行方差分析进行显著性检验后, 再进行两两比较 t 检验。结果显示, 槲皮素组、白藜芦醇组、槲皮素白藜芦醇组合物组荷瘤小鼠体重增加明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且槲皮素白藜芦醇组合物组体重明显高于槲皮素组和白藜芦醇组 ( $P < 0.05$ )。槲皮素、白藜芦醇组、槲皮素白藜芦醇组合物组荷瘤小鼠瘤重明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且槲皮素白藜芦醇组合物组瘤重明显低于槲皮素和白藜芦醇组 ( $P < 0.05$ )。

[0046] 对于荷 MDA-MB-231 细胞的小鼠的实验方法与荷 MCF-7 小鼠相同, 结果相似。

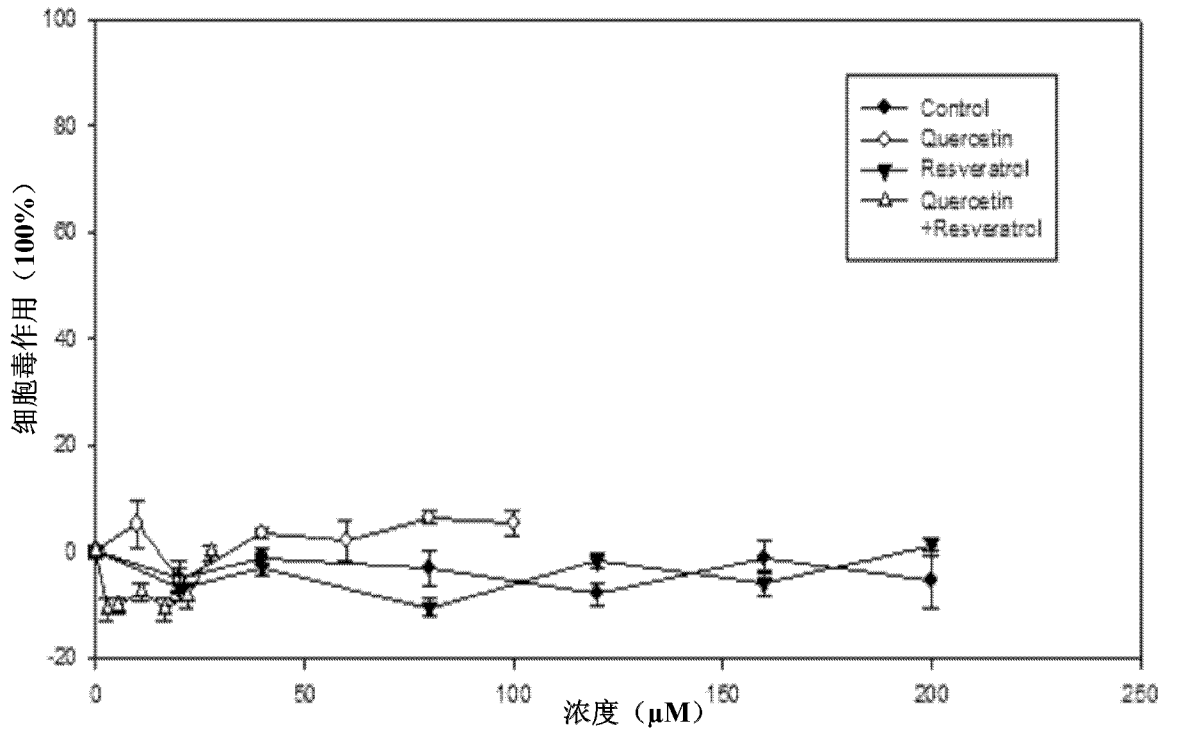


图 1

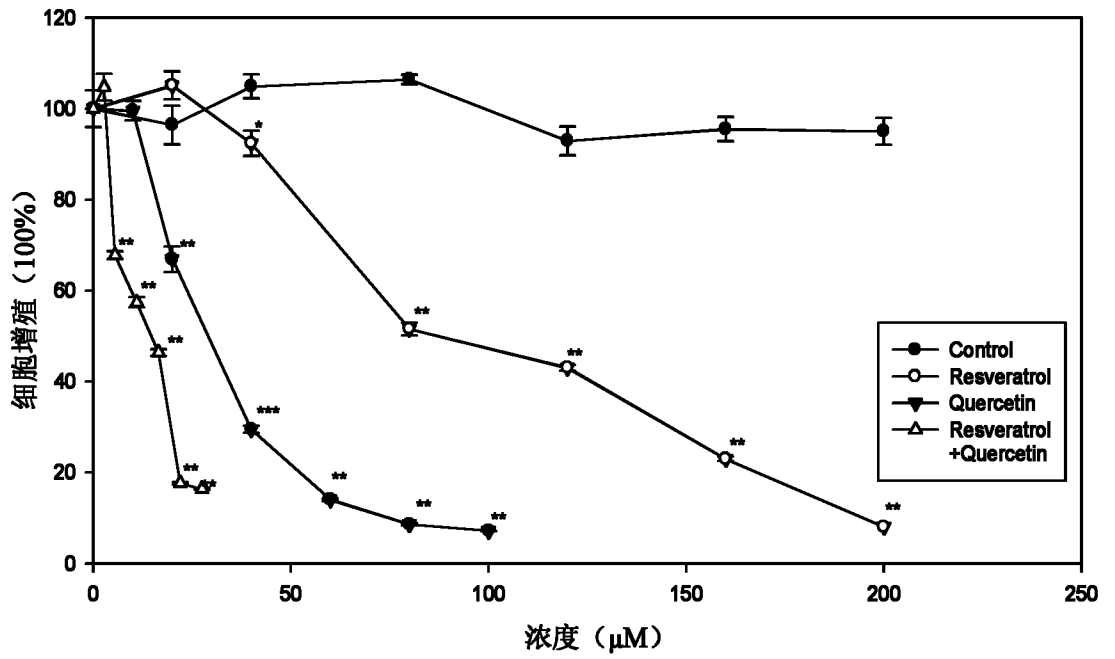


图 2