

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 11 月 16 日 (16.11.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/217179 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/7004 (2006.01) **A61P 1/00** (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) **A61P 39/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/093225

(22) 国际申请日: 2023 年 5 月 10 日 (10.05.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210511886.0 2022年5月11日 (11.05.2022) CN

(71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路
422号, Fujian 361005 (CN)。

(72) 发明人: 吴乔 (WU, Qiao); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。王维嘉 (WANG, Weijia); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。艾元立 (AI, Yuanli); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。陈航姿 (CHEN, Hangzi); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。刘凡健 (LIU, Fanjian); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。洪雪辉 (HONG, Xuehui); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。方伟 (FANG, Wei); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361005 (CN)。

(74) 代理人: 广东金泰智汇专利商标代理事务所 (普通合伙) 等 (GUANGDONG JINTAI ZHIHUI PA-

(54) **Title:** USE OF MANNOSE IN INHIBITING PYROPTOSIS OR RELIEVING TOXIC AND SIDE EFFECTS OF CHEMOTHERAPY DRUG

(54) 发明名称: 甘露糖抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的应用

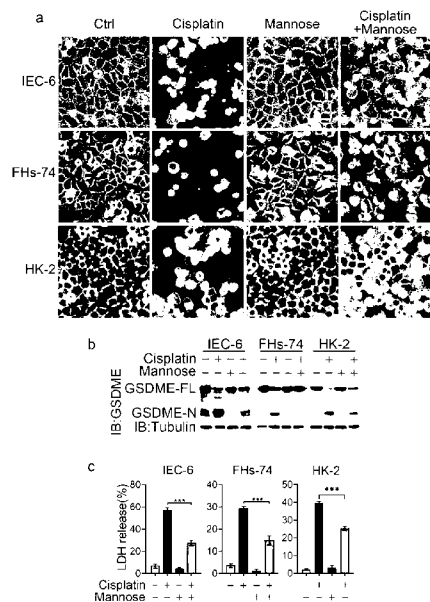


图 1

(57) **Abstract:** Provided is use of mannose in inhibiting pyroptosis or relieving toxic and side effects of a chemotherapy drug, which relates to the field of medical science and technologies. Mannose inhibits pyroptosis induced by a chemotherapy drug, such that toxic and side effects caused by the chemotherapy drug on the intestinal tract and the kidney are relieved, and meanwhile, a treatment effect of the chemotherapy drug on a tumor is not affected. Mannose can be used for preparing a drug, a kit, a pharmaceutical composition or a health care product for inhibiting pyroptosis or relieving toxic and side effects of the chemotherapy drug. Side effects caused by the chemotherapy drug on the kidney and the intestinal tract can be relieved. Mannose can be used as a supplementary drug clinically, the toxic and side effects of the chemotherapy drug are relieved as much as possible while the curative effect of the chemotherapy drug is ensured, the physical and psychological health of the patient is improved, and meanwhile, the tumor inhibition effect of the chemotherapy drug is not affected. Therefore, a new choice for clinical medication is provided for a cancer patient.

(57) **摘要:** 甘露糖抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的应用, 涉及医药科技领域。甘露糖通过抑制化疗药物诱导的细胞焦亡, 进而缓解化疗药物导致的肠道和肾脏等毒副作用, 同时不会影响化疗药物对肿瘤的治疗效果。甘露糖可在制备抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的药物、试剂盒、药物组合物或保健品中应用。可减轻化疗药物引起肾脏和肠道的副作用。可作为补充药物用于临床, 在保证化疗药物疗效的同时, 尽可能减轻化疗药物的毒副作用, 提升患者的身心健康, 同时不影响化疗药物抑制肿瘤的效果; 为癌症患者的临床用药提供新选择。

TENT & TRADEMARK AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP) et al.); 中国广东省东莞市莞城街道东城西路莞城段 181 号 1 号楼 2 单元 513 室, Guangdong 523000 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

甘露糖抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的应用

技术领域

本发明涉及医药科技领域，尤其是涉及甘露糖抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的应用。

背景技术

癌症是一类严重威胁人类健康的疾病。目前对癌症治疗的方法仍有很大的局限性，特别是癌症治疗过程中患者承受着巨大的痛苦。化学治疗(简称化疗)是利用化学合成药物杀伤肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞生长的方法，是临床恶性肿瘤治疗中最常见的一种手段。化疗的作用范围是全身性，在杀死肿瘤细胞的同时也会杀死大量的正常组织细胞，由此造成化疗的毒副作用。化疗过程中常见的毒副作用主要有：脱发、口腔及喉咙溃疡、恶心、呕吐、腹泻、便秘、骨髓造血功能降低、神经及肌肉系统损伤等，影响生殖器官的功能、对肾脏、心脏等器官也会造成损伤。尽管在化疗前或化疗中会给予止吐、护胃、抗生素干预，物理防护等措施，进行饮食调整，一定程度上减轻化疗过程带给患者的痛苦，但患者受到化疗药物的毒副作用依然很严重。因此，寻找和发现能够减轻化疗带给患者痛苦的临床药物意义重大。

研究发现，化疗药物引起机体的毒副作用与正常组织器官中 GSDME 介导的细胞焦亡密切相关，阻断细胞焦亡可以有效缓解化疗药物引起的毒副作用

(WANG Y,GAO W,SHI X,et al.Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3cleavage of a gasdermin[J].Nature,2017,547(7661):99- 103)。

甘露糖是一种治疗尿道感染的药物(KRANJČEC B, PAPEŠ D,ALTARAC S.D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women:a randomized clinical trial[J].World J Urol,2014,32(1):79- 84)，也可以抑制肿瘤生长并且增强化疗药物治疗肿瘤的效果

(GONZALEZ P S,O"PREY J,CARDACI S,et al.Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J].Nature,2018,563(7733):719- 723)，但是关于甘露糖的其他功能研究很少。

因此，仍亟需一种降低化疗药物的毒副作用，减轻化疗过程带给患者的痛苦的方法。

发明内容

发明概述

为解决上述技术问题，本发明提供一种甘露糖在制备抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的药物、试剂盒、药物组合物或保健品中应用。所述甘露糖能有效抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用，所述毒副作用为器官损伤，具有预料不到的有益效果。

发明详述

本发明的目的在于提供甘露糖抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的新用途。甘露糖为一种单糖类物质。

细胞实验发现,甘露糖可以抑制临床化疗药物顺铂或者奥沙利铂(oxaliplatin)引起的正常细胞焦亡(包括检测细胞焦亡形态、GSDME 剪切和 LDH 释放等焦亡金标准)。小鼠实验进一步显示,甘露糖通过抑制顺铂或者奥沙利铂诱导组织细胞焦亡,能够显著缓解其引起的毒副作用(包括缓解顺铂或者奥沙利铂导致的小鼠小肠绒毛以及结直肠的缩短和肾功能降低),从而为减轻化疗药物的毒副作用提供重要的实验依据。

本发明提供甘露糖在制备抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的药物、试剂盒、药物组合物或保健品中的应用,所述毒副作用为器官损伤。

在一些实施例中,所述器官包括肠道或肾脏。

在一些实施例中,所述化疗药物为顺铂、卡铂、奥沙利铂、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、白消安、氮芥、苯丁酸氮芥、塞替派、卡莫司汀、尼莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、培美曲塞、甲氨蝶呤、氟脲嘧啶、卡培他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、阿柔比星、伊达比星、博来霉素、丝裂霉素、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、喜树碱、伊立替康、托泊替康、紫杉醇、多西紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇脂质体、依托泊苷、替尼泊苷、丙卡巴肼、达卡巴嗪、替莫唑胺、L-门冬酰胺酶、去甲斑蝥素、甲基斑蝥素等常见的临床化疗药物或其药学上可接受的盐中的至少一种。

由于上述化疗药物共同特征都是诱导凋亡,甘露糖对这些药物引起的毒副作用都具有缓解效果。

在一些实施例中,所述药物组合物包含甘露糖,或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

在一些实施例中,所述试剂盒包括(i)包含甘露糖的试剂,和(ii)包含化疗药物的试剂。

在一些实施例中,本发明提供甘露糖在制备用于抑制化疗药物诱导正常肠和肾细胞焦亡的药物中应用。

在一些实施例中,本发明提供甘露糖在制备用于缓解化疗药物导致肠道毒副作用的药物中应用。

在一些实施例中,本发明提供甘露糖在制备用于缓解化疗药物导致肾脏毒副作用的药物中应用。

在一些实施例中,所述药物还包含有效量的化疗药物。

在一些实施例中,所述药物可制成以下剂型:片剂、胶囊、粒剂、注射液等。

在一些实施例中,所述甘露糖可以是粉末状、溶液状或其他形式以及可以代谢产生甘露糖的物质,或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

在一些实施例中,所述甘露糖可抑制化疗药物诱导的肠细胞焦亡。

在一些实施例中,所述甘露糖可抑制化疗药物诱导的肾细胞焦亡。

在一些实施例中,所述甘露糖可缓解化疗药物引起的小鼠小肠和结直肠的毒副作用。

在一些实施例中,所述甘露糖可缓解化疗药物引起的小鼠肾的毒副作用。

在一些实施例中,所述甘露糖可减轻化疗药物毒副作用且不影响疗效。

在一些实施例中,根据前述任一方面,本发明提供一种抑制化疗药物诱导的正常肠细胞和肾细胞焦亡

的方法，所述方法包括使正常细胞与(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物的试剂接触，所述试剂可以是同时或者序贯地与所述细胞接触。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供一种减轻化疗药物引起的肠道毒副作用的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物，所述肠道是小肠和结直肠。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供一种减轻化疗药物引起的肾脏毒副作用的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供一种减轻化疗药物毒副作用且不影响疗效的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于抑制化疗药物诱导正常肠和肾细胞焦亡药物的用途，该药物可以抑制正常肠和肾细胞焦亡。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物引起肠道毒副作用的药物中的用途，该药物可以缓解化疗药物导致的肠道毒副作用。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物引起肾脏毒副作用的药物中的用途，该药物可以缓解肾脏组织毒副作用及其相关肾功能指标，如血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C。

在一些实施例中，根据前述任一方面，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物毒副作用且不影响疗效的药物中的用途，该药物可以缓解化疗药物导致的毒副作用且不影响疗效。

在一些实施例中，根据前述任一方面，所述甘露糖可以是粉末状、溶液状或其他形式以及可以代谢产生甘露糖的物质，或其药学上可接受的盐。

有益效果

本发明研究发现，甘露糖具有抑制正常细胞焦亡的功能。重要的是，通过甘露糖抑制的细胞焦亡能够对正常组织器官产生保护功能，大大减轻化疗药物引起的毒副作用。现有缓解化疗药物毒副作用的药物通常是减轻化疗引起的一些症状或增强器官的功能，治疗效果有限，治标不治本；而甘露糖可以从根本上抑制肠道和肾脏细胞的焦亡，进而从根本上减轻毒副作用的发生，治疗效果更佳，采用甘露糖配合化疗药物辅助治疗尤其适用于肾功能低下或有肠道问题的患者。可作为补充药物用于临床，在保证化疗药物疗效的同时，尽可能减轻化疗药物的毒副作用，提升患者的身心健康，同时不影响化疗药物抑制肿瘤的效果；为癌症患者的临床用药提供新选择。

附图说明

图 1 为实施例 1 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)诱导正常肠细胞(IEC-6 和 FHs 74 细胞)和肾细胞(HK-2 细胞)焦亡的结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 1 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)诱导正常肠细胞(IEC-6 和 FHs 74 细胞)和肾细胞(HK-2 细胞)焦亡后的形态观察图; 图 b 为实施例 1 中不同处理组别中顺铂诱导正常细胞后的 GSDME 蛋白剪切情况的蛋白电泳对比图; 图 c 为实施例 1 中不同处理组别中顺铂诱导正常细胞后的 LDH 释放统计图。

图 2 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起的小鼠肠道毒副作用结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠结直肠长度变化对比图; 图 b 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠小肠绒毛变化或隐窝变化对比图; 图 c 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 3 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起的小鼠肾脏毒副作用结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后的小鼠的肾 PAS 染色结果图; 图 b 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起的小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)、胱抑素 C 水平变化统计图; 图 c 为实施例 2 中不同处理组别中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠肾脏 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 4 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后裸鼠中移植瘤体积变化结果对比图; 其中图 a 为不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后裸鼠中移植瘤体积变化统计图; 图 b 为不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后裸鼠中移植瘤的图片。

图 5 为实施例 3 中在移植瘤荷载小鼠模型中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠肠道毒副作用的结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠结直肠长度变化对比图; 图 b 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠小肠绒毛变化或隐窝变化结果图; 图 c 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 6 为实施例 3 中在移植瘤荷载小鼠模型中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠肾脏毒副作用结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠的肾 PAS 染色图; 图 b 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠的血尿素氮(BUN)、血肌酐(creatinine)、血胱抑素 C 水平变化统计图; 图 c 为实施例 3 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠肾脏 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 7 为实施例 4 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后原发肝癌体积变化对比图。

图 8 为实施例 4 中在原发肝癌小鼠模型中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠肠道毒副作用的结果对比图; 其中, 图 a 为实施例 4 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠结直肠长度变化对比图; 图 b 为实施例 4 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠小肠绒毛变化或隐窝变化对比图; 图 c 为实施例 4 中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图9为实施例4中在原发肝癌小鼠模型中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠肾脏毒副作用结果对比图；其中，图a为实施例4中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理后的小鼠肾PAS染色对比图；图b为实施例4中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理引起小鼠血尿素氮(BUN)、血肌酐(creatinine)、血胱抑素C水平变化对比统计图；图c为实施例4中不同处理组中化疗药物顺铂(Cisplatin)处理几批小鼠肾脏GSDME蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图10为实施例5中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理后原发肝癌体积变化对比图。

图11为在原发肝癌小鼠模型中，实施例5中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠肠道毒副作用结果对比图；其中，图a为实施例5中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠结直肠长度变化图；图b为实施例5中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠小肠绒毛变化或隐窝变化的对比图；图c为实施例5中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理后小鼠小肠GSDME蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图12为实施例6中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理后原发胃癌的体积变化对比图。

图13为实施例6中在原发胃癌小鼠模型中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠肠道毒副作用结果对比图；其中，图a为实施例6中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠结直肠长度变化对比图；图b为实施例6中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理引起小鼠小肠绒毛变化或隐窝变化的对比图；图c为实施例6中不同处理组中化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)处理后小鼠小肠GSDME蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图14为实施例7中在细胞焦亡诱导剂CCCP/FeSO₄处理条件下，黑色素瘤细胞A375细胞焦亡情况对比图；其中图a为不同处理组中的细胞形态观察图；图b为不同处理组中GSDME蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图；图c为不同处理组别中细胞的LDH释放统计图。

图15为实施例7中己糖胺生物合成途径(Hexosamine-biosynthesis pathway, HBP)中甘露糖(Mannose)的代谢模式图及敲除或抑制关键基因后细胞焦亡情况对比图；图a为甘露糖进入细胞后的代谢模式图；图b为在A375细胞中敲除GFAT1和GFAT2后，不同组别中CCCP/FeSO₄诱导的细胞焦亡情况对比图；图c为在A375细胞中利用GFAT1抑制剂DON处理后，不同组别中CCCP/FeSO₄诱导的细胞焦亡情况对比图；

图16中图a为实施例7中甘露糖激活AMPK，引起AMPK蛋白及其下游蛋白ACC的磷酸化水平升高的蛋白电泳对比图；图16中图b为在A375细胞中利用AMPK活性抑制剂compound C处理后，不同组别中CCCP/FeSO₄诱导的细胞焦亡情况对比图；图16中图c为在A375细胞中敲除AMPK α 1和AMPK α 2后，不同组别中CCCP/FeSO₄诱导的细胞焦亡情况对比图。

图17为实施例7中己糖胺生物合成途径中代谢物水平变化对甘露糖(Mannose)激活AMPK蛋白的效果对比图；图a为在A375细胞中敲除GFAT1和GFAT2后，不同组别中甘露糖诱导的AMPK磷酸化水平变化的对比图；图b为在甘露糖处理条件下，细胞中代谢物GlcNAc-6P和GlcNAc-1P的水平变化图；图c为在不同代谢物处理A375细胞后，不同组别中AMPK磷酸化水平变化的对比图。

图18中图a为实施例7中利用等温滴定量热法(ITC)检测代谢物GlcNAc-6P与蛋白AMPK α 1的相

互作用图；图 18 中图 b 为实施例 7 中代谢物 GlcNAc-6P 对蛋白 AMPK α 1 与蛋白 LKB1 之间相互作用的影响效果图。

图 19 为实施例 7 中蛋白 AMPK α 1 与蛋白 GSDME 相互作用图；其中，图 a 为在 A375 细胞中，利用 co-IP 技术检测蛋白 AMPK α 1 与蛋白 GSDME 之间相互作用图；图 b 为利用体外磷酸化分析实验技术，检测 AMPK 复合物对 GSDME 磷酸化水平影响的蛋白电泳效果图；图 c 为 GSDME 的蛋白磷酸化位点质谱分析结果。

图 20 为实施例 7 中在敲除了 GSDME 蛋白的 A375 细胞中，分别回补 GSDME-Flag 蛋白和磷酸化模拟蛋白 GSDME^{T6E}-Flag，不同组别中 CCCP/FeSO₄ 诱导的细胞焦亡情况对比图。

图 21 为实施例 8 中在肠道特异性敲除 AMPK 小鼠模型 (AMPK-DKO) 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠肠道毒副作用结果对比图；其中，图 a 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠结直肠长度变化图；图 b 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠小肠绒毛变化和隐窝变化的对比图；图 c 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理后小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 22 为实施例 8 中在全身性敲入 GSDME^{T6E} 点突变小鼠中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠肠道毒副作用结果对比图；其中，图 a 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠结直肠长度变化图；图 b 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠小肠绒毛变化和隐窝变化的对比图；图 c 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理后小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 23 为实施例 8 中在全身性敲入 GSDME^{T6E} 点突变小鼠中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠肾脏毒副作用结果对比图；其中，图 a 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理后的小鼠肾 PAS 染色对比图及损伤统计图；图 b 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理引起小鼠血液尿素氮 (BUN)、肌酐 (creatinine)、胱抑素 C 水平变化对比统计图；图 c 为实施例 8 中不同处理组中化疗药物顺铂 (Cisplatin) 处理几组小鼠肾脏 GSDME 蛋白的剪切情况的蛋白电泳对比图。

图 24 为实施例 9 中甘露糖 (Mannose) 缓解化疗患者肠道毒副作用的效果统计图；图 a 为不同组别患者在接收 XELOX 化疗方案治疗后每日腹泻次数统计图；图 b 为不同组别患者粪便中白细胞检测结果统计图。

术语定义：

本发明中，“室温”表示环境温度，可以为 20℃-30℃；在一些实施例中，为 22℃-28℃；在一些实施例中，为 24℃-26℃；在一些实施例中，为 25℃。

在本发明的上文中，无论是否使用“大约”或“约”等字眼，所有在此公开了的数字均为近似值。基于公开的数字，每一个数字的数值有可能会出现 $\pm 10\%$ 以下的差异或者本领域人员认为的合理的差异，如 $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 4\%$ 或 $\pm 5\%$ 的差异。

术语“任选”、“任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情形可以但不一定出现。例如，“任选的表面活性剂”是指表面活性剂可以存在或可以不存在。

术语“重量百分比”或“以重量计的百分比”或“wt%”定义为组合物中单个组分的重量除以组合物所有组分的总重量然后乘以 100。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项的组合。

术语“wt%”表示质量百分比。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

具体实施方式

为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，下面进一步披露一些非限制实施例以对本发明作进一步的详细说明。

本发明所使用的试剂均可以从市场上购得或者可以通过本发明所描述的方法制备而得。

在一个实施方案中，本发明提供一种单糖类物质甘露糖,或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。

任选地，所述甘露糖抑制化疗药物诱导的肠细胞焦亡。

任选地，所述甘露糖抑制化疗药物诱导的肾细胞焦亡。

任选地，所述甘露糖缓解化疗药物引起的小鼠小肠和结直肠的毒副作用。

任选地，所述甘露糖缓解化疗药物引起的小鼠肾脏的毒副作用。

任选地，所述甘露糖缓解化疗药物毒副作用且不影响化疗药物的疗效。

在一个实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括(i)包含甘露糖的试剂，(ii)包含化疗药物的试剂。仅作为参考，甘露糖与化疗药物的比例可为 20~50:1。

在一个实施方案中，本发明提供一种抑制化疗药物诱导的正常肠细胞和肾细胞焦亡的方法，所述方法包括使正常细胞与(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物的试剂接触，所述试剂可以是同时或者序贯地与所述细胞接触。

在一个实施方案中，本发明提供一种减轻化疗药物引起的肠道毒副作用的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物，所述肠道是小肠和结直肠。

在一个实施方案中，本发明提供一种减轻化疗药物引起的肾脏毒副作用的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物。

在一个实施方案中，本发明提供一种减轻化疗药物毒副作用且不影响疗效的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的药物，所述试剂可以是同时或序贯地施用(i)包含有效量的甘露糖的试剂和(ii)包含有效量的化疗药物。

在一个实施方案中，本发明提供了包含甘露糖的试剂在制备用于抑制化疗药物诱导正常肠和肾细胞焦亡的药物中的用途，该药物可以抑制化疗药物引起的正常肠和肾细胞的焦亡。

在一个实施方案中，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物引起的肠道毒副作用的药物中的用途，该药物可以缓解化疗药物引起的小肠毒副作用。

在一个实施方案中，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物引起的肾脏毒副作用的药物中的用途，该药物可以缓解化疗药物引起的肾脏组织毒副作用及其相关肾功能指标，如血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C。

在一个实施方案中，本发明提供包含甘露糖的试剂在制备用于缓解化疗药物毒副作用且不影响疗效的药物中的用途，该药物可以缓解化疗药物导致的毒副作用且不影响疗效。

在一个实施方案中，所述甘露糖可以是粉末状，溶液状或其他形式以及可以代谢产生甘露糖的物质，或其药学上可接受的盐。

在一个实施方案中，所述化疗药物可为顺铂，卡铂、奥沙利铂、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、白消安、氮芥、苯丁酸氮芥、塞替派、卡莫司汀、尼莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、培美曲塞、甲氨蝶呤、氟脲嘧啶、卡培他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、阿柔比星、伊达比星、博来霉素、丝裂霉素、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、喜树碱、伊立替康、托泊替康、紫杉醇、多西紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇脂质体、依托泊苷、替尼泊苷、丙卡巴肼、达卡巴嗪、替莫唑胺、L-门冬酰胺酶、去甲斑蝥素、甲基斑蝥素等常见的临床化疗药物或其药学上可接受的盐中的至少一种。

在一个实施方案中，本发明所涉及的药物还可按本领域已知方法配成肠道或非肠道给药的其它药学上可接受的剂型，如片剂、胶囊、粒剂、注射液等。

术语“有效量”指产生本发明抑制正常细胞焦亡或减轻化疗药物引起的毒副作用等技术效果或在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的本发明化合物的量。这样的量通常依若干因素变化，而所述变化是在已知本文提供的描述的普通技术人员能够确定和计算的范围内。这些因素包括，但不限于：特定的个体及其年龄、体重、身高、一般身体状况和医疗经历，所使用的特定化合物，化合物配制于其中的载体，所选择的化合物的施用途径，以及被治疗的病症的性质和严重性。

术语“药物组合物”指包含甘露糖以及依施用方式和剂型的性质而定的至少一种选自以下药学上可接受的成分的组合物，包括：载体、稀释剂、佐剂、赋形剂，例如防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、矫味剂、香味剂、抗菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂。悬浮剂的实例包括乙氧化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄耆胶、或这些物质的混合物。通过多种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等，能够确保预防微生物的作用。最好包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。通过使用延迟吸收剂，例如单硬脂酸铝和明胶，能够使注射剂型延长吸收。适宜的载体、稀释剂、溶剂或赋形剂的实例包括水、乙醇、多元醇、它们的适宜的混合物、植物油(例如橄榄油)、和注射有机酯例如油酸乙酯。赋形剂的实例包括乳糖、枸橼酸钠、碳酸钙、磷酸二钙。崩解剂的实例包括淀粉、藻酸和一些复合硅酸盐。润滑剂的实例包括硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠、滑石以及高分子量聚乙二醇。

术语“药学上可接受”指在合理的医疗判断范围内，适用于与人和低等动物细胞接触而没有过度的毒性、刺激性、变应性反应等，且与合理的益处/风险比相应。

术语“药学上可接受的剂型”指本发明化合物的剂型，包括例如片剂、糖锭剂、散剂、酏剂、糖浆剂、液体制剂(包括混悬剂、喷雾剂、吸入片剂、锭剂、乳剂、溶液剂、颗粒剂、胶囊剂和栓剂)以及用于注射的液体制剂，包括脂质体制剂。可在 Remington's Pharmaceutical Science、Mack Publishing Co.、Easton、PA 等中发现配制技术和制剂。

术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适载体描述于最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences 中，这是本领域的标准参考书目。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和 5% 的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体，例如固定化油。将此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。除去任何常规的介质或试剂与抗体不相容之外，设想其在组合物中的用途。

术语“缓解”一般是指获得症状上和/或病理上的减轻效应。该效应可是化疗过程中组织器官的毒副作用的减少或严重程度降低；也可是症状上的减轻，例如呕吐、腹泻等症状上的减轻；也可是病人化疗过程中精神上的宽慰，例如疼痛感降低、心情更加放松愉悦等效果。

术语“药学上可接受的盐”表示本发明化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐、碱加成盐等。这些盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中原位制备。特别是，可以通过独立使纯化的游离碱形式的化合物与适宜的有机或无机酸反应，和将如此形成的盐分离，来制备酸加成盐。由形成药学上可以接受的阴离子的有机酸形成的有机酸加合盐，包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐；优选地，所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐；所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。也可形成合适的无机盐，包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸

盐或磷酸盐等。示例性酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、naphthylate、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐(lactobionate)、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-b-羟基苯甲酸盐、龙胆酸盐、异硫代硫酸盐、二对甲苯酰酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己氨基磺酸盐和奎尼酸盐月桂基磺酸盐(quinateslaurylsulphonate)等(参见 Berge 等人, PharmaceuticalSalts, J.Pharm.Sci., 66: 1-9(1977)和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第 1418 页)。也可以通过独立进行使纯化的酸形式的化合物与适宜的有机或无机碱反应, 和分离如此形成的盐, 来制备碱加成盐。碱加成盐包括药学上可接受的金属盐和胺盐。适宜的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。钠和钾盐为优选。适宜的无机碱加成盐是由金属碱制备的, 所述金属碱包括氢化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁和氢氧化锌。适宜的胺碱加成盐是由胺制备的, 所述胺具有足够的碱性以形成稳定的盐, 并且优选包括由于其药用的低毒性和可接受性而在医药化学中常用的那些胺, 所述胺的实例包括氨、乙二胺、N-甲基-葡萄糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N, N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙胺、二乙胺、哌嗪、三(羟基甲基)-氨基甲烷、四甲基氢氧化铵、三乙胺、二苄胺、二苯羟甲胺、脱氢松香胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸例如赖氨酸和精氨酸、二环己基胺等。

下面将结合附图和具体实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 本领域技术人员将会理解。下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J.萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译的《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1

甘露糖(Mannose)对化疗药物顺铂(Cisplatin)诱导正常细胞焦亡的影响。

实验方法如下:

1.细胞处理:

(1)取对数生长期的正常细胞株大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)、人小肠上皮细胞(FHs 74)和人肾小管上皮细胞(HK-2), 以 4×10^5 细胞/mL 密度接种于 6 孔培养板上。

(2)培养过夜后, 将培养液更换成含 0.5% 血清的 DMEM 培养基, 分别用 Cisplatin (顺铂) (10 μ g/mL, 溶解在 DMF)、Mannose (甘露糖) (20mM, 溶解在 H₂O)、Cisplatin+Mannose 组合物处理细胞。

2.显微镜形态观察:

细胞处理 24h 后, 显微镜观察细胞形态并拍照。细胞发生焦亡过程中细胞吸水胀大, 细胞膜破裂, 细胞呈现鼓泡形态。

3. 免疫印迹(Western blotting)检测:

(1)收集培养液, 于离心机中 3000r/min 离心 5min, 收集部分悬浮的死亡细胞, 离心后弃掉上清置于冰上。

(2)根据细胞量在 6 孔培养板中每孔加入适量细胞裂解缓冲液 A(50mM Tris, pH 7.4, 300mM NaCl, 1% NP-40, 临用前加 1mM PMSF 和全酶抑制剂 Cocktail), 然后用超声波破碎仪破碎细胞, 并于冷冻离心机中 13000r/min, 4℃离心 30min;

(3)将上清吸出, 加入等体积的 2×SDS 样品缓冲液, 95℃煮 15min, 进行如下 Western blotting 检测。

(4)蛋白电泳: 取 2~10μg 蛋白样品, 于不连续 SDS-PAGE 胶中电泳, 电压 100V, 待样品进入分离胶后将电压调为 150V。

(5)电转移: 电转液于 4℃预冷, 切好胶后将同样大小的甲醇预处理的 PVDF 膜以及滤纸浸于电转液中; PVDF 膜贴于胶后, 两面覆盖滤纸, 赶尽气泡, 按膜朝正极的顺序装于电转槽中, 于冰上电转(100V, 60min)。

(6)抗原抗体反应:

封闭: 封闭液室温封闭 1h; 一抗反应: 封闭后膜与相应一抗于室温孵育 1~3h;

二抗反应: TBST 洗 3 次, 每次 5min, 之后加入相应的二抗, 于室温孵育 1~3h。

(7)曝光成像: TBST 洗 3 次, 每次 10min。配制 ECL 的 A 液和 B 液以 1:1(V/V)混和, 用显影机进行曝光成像。

4. 乳酸脱氢酶(LDH)释放检测:

细胞处理 24h 后, 按 promega 公司细胞毒性检测试剂盒的方法和步骤检测细胞外乳酸脱氢酶的含量。细胞凋亡或坏死(包括细胞焦亡)造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液, 其中包括酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactatedehydroge-nase, LDH)。通过检测从细胞膜破裂释放到培养液中的 LDH 活性, 就可以实现对细胞毒性的定量分析。

结果及结果分析: 图 1 给出甘露糖抑制化疗药物顺铂诱导的正常肠细胞和肾细胞焦亡的结果。

由图 1 的图 a 可知, 甘露糖能抑制顺铂诱导正常细胞的焦亡形态。顺铂显著诱导大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)、人小肠上皮细胞(FHs 74)和人肾小管上皮细胞(HK-2)发生肿胀, 细胞膜破裂。本发明所述甘露糖与顺铂共处理组相对于顺铂组细胞肿胀、细胞膜破裂的细胞比例显著减少, 表明本发明所述甘露糖能够抑制顺铂诱导的细胞焦亡。

由图 1 的图 b 可知, 甘露糖能抑制顺铂诱导正常细胞的 GSDME 蛋白剪切。顺铂显著诱导大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)、人小肠上皮细胞(FHs 74)和人肾小管上皮细胞(HK-2)发生 GSDME 蛋白剪切。本发明

所述甘露糖与顺铂共处理组相对于顺铂组 GSDME 蛋白剪切的比例显著减少,表明本发明所述甘露糖能够抑制顺铂诱导的 GSDME 蛋白剪切。

由图 1 的图 c 可知,甘露糖能抑制顺铂诱导正常细胞的 LDH 释放。顺铂显著诱导大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)、人小肠上皮细胞(FHs 74)和人肾小管上皮细胞(HK-2)发生细胞膜破裂以及乳酸脱氢酶的释放。本发明所述甘露糖与顺铂共处理组相对于顺铂组 LDH 释放的比例显著减少,表明本发明所述甘露糖能够抑制顺铂诱导的细胞质膜破裂,抑制细胞焦亡。

实验结果表明,本发明所述甘露糖与顺铂共处理组相对于顺铂组 LDH 释放的比例显著减少。说明本发明所述甘露糖能够抑制顺铂诱导的细胞膜破裂,抑制细胞焦亡。

每组实验设置 3 次独立重复,然后应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;具差异极其显著性。统计分析表明甘露糖可以抑制顺铂诱导的细胞膜破裂和细胞焦亡($p<0.001$)。

实施例 2

甘露糖对化疗药物顺铂引起的小鼠肠道和肾脏毒副作用的影响。

实验方法如下:

1.小鼠处理:

(1)将 SPF 级的 C57BL/6 小鼠(~20g)随机分为四组,分别为对照组(Ctrl)、甘露糖组(Mannose)、顺铂组(Cisplatin)、顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose),饲养在 12h 光照,12h 黑暗环境中。

(2)对照组(Ctrl)小鼠每天用 500 μ L 无菌水进行灌胃处理,甘露糖组(Mannose)和顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)小鼠进行甘露糖(Mannose,溶解于 H₂O 中)灌胃预处理,每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500 μ L,每天处理一次,共处理 5 天。

(3)顺铂组(Cisplatin)和顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)小鼠进行顺铂(Cisplatin,溶于 PBS 中)处理,顺铂采用腹腔注射的方式,剂量为 18mg/kg,在甘露糖处理一天后注射一次。

2.小鼠结直肠长度测量:

小鼠经过药物处理结束后,断颈处死小鼠,取出小鼠的结直肠进行拍照和长度测量。

3.组织化学染色分析:

取出小鼠的小肠进行 H&E 组织化学染色分析:

(1)用 PBS 将小肠内容物冲洗干净。取 5cm 左右长度的小肠,沿纵轴剖开,然后将小肠卷成“瑞士卷”的形状。

(2)卷好的小肠组织用 4%的多聚甲醛进行固定过夜。

(3)固定好的组织随后进行脱水、石蜡包埋。

(4)包埋好的组织进行石蜡切片。

(5)切好的组织进行脱蜡复水，之后进行苏木精-伊红染色。

(6)封片后进行镜检。

取出小鼠肾脏进行 PAS 组织化学染色分析：

(1)将小鼠肾脏用 PBS 洗净。

(2)肾脏组织用 4%的多聚甲醛进行固定过夜。

(3)固定好的组织随后进行脱水、石蜡包埋。

(4)包埋好的组织进行石蜡切片。

(5)切好的组织进行脱蜡复水，进行 PAS 染色。PAS 染色法(Periodic Acid- Schiff stain)在组织学上主要用来检测组织中的糖类。过碘酸把糖类相邻两个碳上的羟基氧化成醛基，再用 Schiff 试剂和醛基反应使其呈现紫红色。当肾脏受到损伤后，尿调节蛋白(Uromodulin)剧烈增加，并被 PAS 染色。因此 PAS 染色能够反映肾脏的损伤程度。

(6)封片后进行镜检。

4.免疫印迹(Western blotting)检测：

取出小鼠小肠和小鼠肾脏，用 PBS 冲洗干净。剪取 5mm 小肠段或剪取 0.1g 的肾脏组织，加 1.5mL 2×SDS 样品缓冲液置于组织破碎仪中进行裂解。95℃煮 15min，待进行 Western blotting 检测(检测方法参考实施例 1)。

5.血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C(Cystatin C)含量检测：

小鼠经过药物处理后，采用眼球取血的方法进行取血，血液在 37℃凝固后，3000r/min 离心 5min 收集血清。血清送医院检测血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 等肾功能相关指标。如果血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 含量显著升高，表示肾功能受损。

结果及结果分析：甘露糖能缓解顺铂引起的小鼠肠道毒副作用，试验结果参见图 2。

由图 2 的图 a 可知，甘露糖可以缓解顺铂引起的结直肠缩短。甘露糖组(Mannose)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度没有变化，顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度显著缩短，顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠结直肠长度显著恢复正常。说明发明所述甘露糖处理不会影响小鼠结直肠长度，且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用。

图 2 的图 a 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明甘露糖处理不会影响小鼠结直肠长度($p>0.05$)，且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用($p<0.01$)。

由图 2 的图 b 可知,甘露糖可以缓解顺铂引起的小肠绒毛和隐窝损伤。甘露糖组(Mannose)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛和隐窝没有变化,顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛数量减少、长度缩短以及小肠隐窝的减少,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠绒毛和小肠隐窝显著恢复正常。说明发明所述甘露糖处理不会影响小鼠小肠绒毛和小肠隐窝,且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤。

图 2 的图 b 中,应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;ns 表示 $p>0.05$,没有显著差异。统计分析表明甘露糖处理不会影响小鼠小肠绒毛和隐窝($p>0.05$),且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤($p<0.001$)。

由图 2 的图 c 可知,甘露糖可以抑制顺铂引起的小肠 GSDME 蛋白剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠 GSDME 显著剪切,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠 GSDME 剪切显著减少。说明发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物顺铂引起小鼠小肠 GSDME 的剪切。

甘露糖缓解顺铂引起的小鼠肾脏毒副作用试验结果参见图 3。

由图 3 的图 a 可知,甘露糖可以缓解顺铂引起的肾脏毒副作用。甘露糖组(Mannose)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏组织情况没有变化,顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 PAS 染色显著更强,对肾脏损伤程度打分(Tubular injury score)也显示肾脏显著损伤,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏组织显著恢复正常,肾脏损伤程度打分也显著更低。说明发明所述甘露糖处理不会影响小鼠肾脏,且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤。

图 3 的图 a 中,应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;ns 表示 $p>0.05$,没有显著差异。统计分析表明甘露糖处理不会影响小鼠肾脏($p>0.05$),且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤($p<0.001$)。

由图 3 的图 b 可知,甘露糖可以缓解顺铂引起的肾功能损伤。甘露糖组(Mannose)相较于对照组(Ctrl)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 含量没有变化,顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 含量显著升高,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 显著恢复正常。说明发明所述甘露糖处理不会影响小鼠肾脏,且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤。

图 3 的图 b 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p<0.05$, 具差异显著性; **表示 $p<0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p<0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p>0.05$, 没有显著差异。统计分析表明甘露糖处理不会影响小鼠的肾功能($p>0.05$), 且可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤($p<0.001$)。

由图 3 的图 c 可知, 甘露糖可以抑制顺铂引起的肾脏 GSDME 蛋白剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 GSDME 显著剪切, 顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏 GSDME 剪切显著减少。说明发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物顺铂引起小鼠肾脏 GSDME 的剪切。

实施例 3

甘露糖对化疗药物顺铂抑制裸鼠移植瘤生长以及对顺铂引起毒副作用的影响。

实验方法如下:

1. 小鼠处理:

(1)将 MKN45 细胞按每只 2×10^6 细胞量接种到免疫缺陷型裸鼠, 接种后第 8 天开始给药处理。

(2)将 SPF 级的免疫缺陷小鼠($\sim 20g$)随机分为四组, 分别为对照组(Ctrl)、甘露糖组(Mannose)、顺铂组(Cisplatin)、顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose), 饲养在 12h 光照, 12h 黑暗环境中。

(3)对照组(Ctrl)小鼠每天用 500 μ L 无菌水进行灌胃处理, 甘露糖组(Mannose)和顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)小鼠进行甘露糖(Mannose, 溶解于 H_2O 中)灌胃预处理, 每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500 μ L, 每天处理一次, 共处理 7 天。

(4)顺铂组(Cisplatin)和顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)小鼠进行顺铂(Cisplatin, 溶于 PBS 中)处理, 顺铂采用腹腔注射的方式, 剂量为 12mg/kg, 在甘露糖处理后第一天和第四天分别注射一次。

2. 移植瘤体积和重量测量:

小鼠接受药物处理开始后, 每天测量肿瘤的体积, 小鼠经过药物处理结束后, 断颈处死小鼠, 将移植瘤取出进行拍照和称重。

3. 化疗药物副作用检测:

结直肠长度测量, 小肠 H&E 组织化学染色分析, 小肠和肾脏 GSDME 蛋白剪切检测, 肾脏 PAS 组织化学染色分析, 血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)、胱抑素 C 含量检测(检测方法参考实施例 2)。

结果及结果分析: 甘露糖不会影响化疗药物顺铂对裸鼠移植瘤的抑制效果, 试验结果参见图 4。

由图 4 的图 a 可知, 甘露糖不会影响顺铂对裸鼠移植瘤体积的抑制效果。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肿瘤体积显著减小, 顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肿瘤体积没有变化。表明本发明所述甘露糖不会影响化疗药物顺铂对裸鼠移植瘤体积的抑制效果。

图 4 的图 a 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p<0.05$, 具差异显著性; **表示 $p<0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p<0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p>0.05$, 没有显著差异。统计分析表明甘露糖不会影响化疗药物顺铂对裸鼠移植瘤体积的抑制效果($p>0.05$)。

由图 4 的图 b 可知, 甘露糖不会影响顺铂对裸鼠移植瘤重量的抑制效果。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肿瘤重量显著减小, 顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肿瘤重量没有变化。表明本发明所述甘露糖不会影响化疗药物顺铂对裸鼠移植瘤重量的抑制效果。

图 4 的图 b 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p<0.05$, 具差异显著性; **表示 $p<0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p<0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p>0.05$, 没有显著差异。统计分析表明甘露糖不会影响化疗药物顺铂对裸鼠移植瘤重量的抑制效果($p>0.05$)。

在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的情况下, 甘露糖缓解顺铂引起的小鼠肠道毒副作用试验, 结果参见图 5。

由图 5 的图 a 可知, 在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解顺铂引起的结直肠的毒副作用。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度显著缩短, 顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠结直肠长度显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时, 发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用。

图 5 的图 a 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p<0.05$, 具差异显著性; **表示 $p<0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p<0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p>0.05$, 没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用($p<0.05$)。

由图 5 的图 b 可知, 在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解顺铂引起的小肠绒毛和隐窝的损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛数量减少、长度缩短以及小肠隐窝的减少, 顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠绒毛和小肠隐窝显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时, 发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤。

图 5 的图 b 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p<0.05$, 具差异显著性; **表示 $p<0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p<0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p>0.05$, 没有显著差异。

统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤($p<0.001$)。

由图 5 的图 c 可知,在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以抑制顺铂引起小肠 GSDME 蛋白的剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠 GSDME 显著剪切,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物顺铂引起小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切。

在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的情况下,甘露糖缓解顺铂引起的小鼠肾脏毒副作用试验,结果参见图 6。

由图 6 的图 a 可知,在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以缓解顺铂引起的肾脏组织损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 PAS 染色显著更强,对肾脏损伤程度打分(Tubular injury score)也显示肾脏显著损伤,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏组织显著恢复正常,肾脏损伤程度打分也显著更低。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤。

图 6 的图 a 中,应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;ns 表示 $p>0.05$,没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖(Mannose)可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤($p<0.001$)。

由图 6 的图 b 可知,在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以缓解顺铂引起的肾功能损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 含量显著升高,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐和胱抑素 C 显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤。图 6 的图 b 中,应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;ns 表示 $p>0.05$,没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤($p<0.001$)。

由图 6 的图 c 可知,在不影响顺铂对移植瘤抑制效果的同时,甘露糖可以抑制顺铂引起的肾脏 GSDME 蛋白剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 GSDME 显著剪切,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物顺铂对移植瘤抑制效果的同时,发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物顺铂引起小鼠肾脏 GSDME 的剪切。

实施例 4

甘露糖对化疗药物顺铂抑制原发肝癌发生发展以及对顺铂引起毒副作用的影响。

实验方法如下：

1. 小鼠处理：

(1)构建 DEN/CCl₄ 诱导小鼠原发肝癌模型，具体方法如下：将 2 周大的雄鼠按 25mg/kg 的剂量腹腔注射一针二乙基亚硝胺(DEN，溶于 PBS 中)，一周后开始每周注射一次 10%的四氯化碳(CCl₄，溶于玉米油中)，四氯化碳的剂量为 0.5mL/kg，持续 4~5 个月。

(2)将诱导出肝癌的小鼠随机分为四组，分别为对照组、甘露糖组、顺铂组、顺铂+甘露糖共处理组，饲养在 12h 光照，12h 黑暗环境中。

(3)对照组小鼠每天用 500μL 无菌水进行灌胃处理，甘露糖组和顺铂+甘露糖共处理组小鼠给予甘露糖(Mannose，溶解于 H₂O 中)灌胃处理，每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500μL，每天处理一次，共处理 4 周。

(4)顺铂组和顺铂+甘露糖共处理组小鼠进行顺铂(Cisplatin，溶于 PBS 中)处理，顺铂采用腹腔注射的方式，剂量为 8mg/kg，每周处理一次，共处理 4 周。

2. 原发肝癌体积和数量测量：

小鼠经过药物处理结束后，断颈处死小鼠，取出小鼠肝脏，记录肿瘤数量。

3. 化疗药物副作用检测：

结直肠长度测量，小肠 H&E 组织化学染色分析，小肠和肾脏 GSDME 蛋白剪切检测，肾脏 PAS 组织化学染色分析，血尿素氮、肌酐、胱抑素 C 含量检测(检测方法参考实施例 2)。

结果及结果分析：甘露糖不会影响化疗药物顺铂对原发肝癌的抑制效果，结果参见图 7。

由图 7 可知，顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肝脏肿瘤体积和数量显著减小/少，顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肝脏肿瘤的体积和数量没有变化。表明本发明所述甘露糖不会影响化疗药物顺铂对原发肝癌的抑制效果。图 7 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p < 0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p < 0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p < 0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p > 0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明甘露糖不会影响化疗药物顺铂对原发肝癌的抑制效果($p > 0.05$)。

图 8 给出在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的情况下，甘露糖缓解顺铂引起的小鼠肠道毒副作用试验结果。

由图 8 的图 a 可知，在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解顺铂引起的结直肠的毒副作用。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度显著缩短，顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠结直肠长度显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对

原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用。图 8 的图 a 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠结直肠的毒副作用($p<0.001$)。

由图 8 的图 b 可知，在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可缓解顺铂引起的小肠绒毛和隐窝的损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛数量减少、长度缩短以及小肠隐窝的减少，顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠绒毛和小肠隐窝显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤。应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤($p<0.001$)。

由图 8 的图 c 可知，在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以抑制顺铂引起小肠 GSDME 蛋白的剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠 GSDME 显著剪切，顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠小肠 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物顺铂引起小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切。

在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的情况下，甘露糖缓解顺铂引起的小鼠肾脏毒副作用试验，结果参见图 9。

由图 9 的图 a 可知，在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解顺铂引起的肾脏组织损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 PAS 染色显著更强，对肾脏损伤程度打分(Tubular injury score)也显示肾脏显著损伤。顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏组织显著恢复正常，肾脏损伤程度打分也显著更低。表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤。

图 9 的图 a 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。

统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾脏组织损伤($p<0.001$)。

由图 9 的图 b 可知,在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,甘露糖可缓解顺铂引起的肾功能损伤。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 含量显著升高,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(creatinine)和胱抑素 C 显著恢复正常。表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,发明所述甘露糖可以缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤。图 9 的图 b 中,应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析,所得实验数据以均数±标准误差表示;对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验,*表示 $p<0.05$,具差异显著性;**表示 $p<0.01$,具差异高度显著性;***表示 $p<0.001$,具差异极其显著性;ns 表示 $p>0.05$,没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,甘露糖可缓解化疗药物顺铂引起的小鼠肾功能损伤($p<0.001$)。

由图 9 的图 c 可知,在不影响顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,甘露糖可以抑制顺铂引起的肾脏 GSDME 蛋白剪切。顺铂组(Cisplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肾脏 GSDME 显著剪切,顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin+Mannose)相较于顺铂组(Cisplatin)小鼠肾脏 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物顺铂对原发肝癌抑制效果的同时,发明所述甘露糖处理可抑制化疗药物顺铂引起小鼠肾脏 GSDME 的剪切。

实施例 5

甘露糖对化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)抑制原发肝癌发生发展以及对奥沙利铂引起毒副作用的影响。

实验方法如下:

1.小鼠处理:

(1)构建 DEN/ CCl_4 诱导小鼠原发肝癌模型,具体方法如下:将 2 周大的雄鼠按 25mg/kg 的剂量腹腔注射一针二乙基亚硝胺(DEN,溶于 PBS 中),一周后开始每周注射一次 10%的四氯化碳(CCl_4 ,溶于玉米油中),四氯化碳的剂量为 0.5mL/kg,持续 4~5 个月。

(2)将诱导出肝癌的小鼠随机分为四组,分别为对照组(Ctrl)、甘露糖组(Mannose)、奥沙利铂组(Oxaliplatin)、奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose),饲养在 12h 光照,12h 黑暗环境中。

(3)对照组(Ctrl)小鼠每天用 500 μL 无菌水进行灌胃处理,甘露糖组(Mannose)和奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)小鼠给予甘露糖(Mannose,溶解于 H_2O 中)灌胃处理,每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500 μL ,每天处理一次,共处理 4 周。

(4)奥沙利铂组(Oxaliplatin)和奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)小鼠进行奥沙利铂(Oxaliplatin,溶于 5%葡萄糖溶液中)处理,奥沙利铂采用腹腔注射的方式,剂量为 10mg/kg,每周处理一次,共处理 4 周。

2.原发肝癌体积和数量测量:

小鼠经过药物处理结束后，断颈处死小鼠，取出小鼠肝脏，记录肿瘤数量。

3. 化疗药物副作用检测：

结直肠长度测量，小肠 H&E 组织化学染色分析，小肠和肾脏 GSDME 蛋白剪切检测(检测方法参考实施例 2)。

结果及结果分析：甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌的抑制效果，结果参见图 10。

由图 10 可知，奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠肝脏肿瘤体积和数量显著减小/少，奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠肝脏肿瘤的体积和数量没有变化。表明本发明所述甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)对原发肝癌的抑制效果。图 10 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌的抑制效果($p>0.05$)。

在不影响奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的情况下，甘露糖缓解奥沙利铂引起的小鼠肠道毒副作用试验，结果参见图 11。

由图 11 的图 a 可知，在不影响奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解奥沙利铂引起的结直肠的毒副作用。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度显著缩短，奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠结直肠长度显著恢复正常。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖可以缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠结直肠的毒副作用。图 11 的图 a 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠结直肠的毒副作用($p<0.05$)。

由图 11 的图 b 可知，在不影响奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以缓解奥沙利铂引起的小肠绒毛和隐窝的损伤。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛数量减少、长度缩短以及小肠隐窝的减少，奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠小肠绒毛和小肠隐窝显著恢复正常。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤。图 11 的图 b 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数±标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示 $p<0.01$ ，具差异高度显著性；***表示 $p<0.001$ ，

具差异极其显著性；ns 表示 $p>0.05$ ，没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤($p<0.001$)。

由图 11 的图 c 可知，在不影响奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，甘露糖可以抑制奥沙利铂引起小肠 GSDME 蛋白的剪切。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠 GSDME 显著剪切，奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠小肠 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发肝癌抑制效果的同时，发明所述甘露糖处理可抑制化疗药物奥沙利铂引起小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切。

实施例 6

甘露糖对化疗药物奥沙利铂抑制原发胃癌发生发展以及对奥沙利铂引起毒副作用的影响。

实验方法如下：

1.小鼠处理：

(1)原发胃癌模型：采用在胃上皮细胞持续表达 COX-2/mPGES-1 诱导自发胃癌，48 周大的小鼠用于后续实验。

(2)将原发胃癌的小鼠随机分为四组，分别为对照组(Ctrl)、甘露糖组(Mannose)、奥沙利铂组(Oxaliplatin)、奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)，饲养在 12h 光照，12h 黑暗环境中。

(3)对照组(Ctrl)小鼠每天用 500 μ L 无菌水进行灌胃处理，甘露糖组和奥沙利铂+甘露糖共处理组小鼠给予甘露糖(溶解于 H₂O 中)灌胃处理，每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500 μ L，每天处理一次，共处理 26 天。

(4)奥沙利铂组和奥沙利铂+甘露糖共处理组小鼠进行奥沙利铂(溶于 5%葡萄糖溶液中)处理，奥沙利铂采用腹腔注射的方式，在甘露糖处理一天后开始进行处理，剂量为 3mg/kg，每天一次，按处理 5 天停药 5 天的方式共给药处理 15 次，共 25 天。

2.原发胃癌体积测量：

小鼠经过药物处理结束后，断颈处死小鼠，取出小鼠的胃，记录肿瘤体积。

3.化疗药物副作用检测：

结直肠长度测量，小肠 H&E 组织化学染色分析，小肠和肾脏 GSDME 蛋白剪切检测(检测方法参考实施例 2)。

结果及结果分析：甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌的抑制效果，实验结果参见图 12。

由图 12 可知，奥沙利铂组较于对照组小鼠胃部肿瘤体积显著减小，奥沙利铂+甘露糖共处理组相较于奥沙利铂组小鼠胃部肿瘤的体积没有变化。表明本发明所述甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌的抑制效果。

图 12 中，应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析，所得实验数据以均数 $\pm$ 标准误差表示；对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验，*表示 $p<0.05$ ，具差异显著性；**表示

$p < 0.01$, 具差异高度显著性***表示 $p < 0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p > 0.05$, 没有显著差异。统计分析表明甘露糖不会影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌的抑制效果($p > 0.05$)。

图 13 给出在不影响奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的情况下, 甘露糖缓解奥沙利铂引起的小鼠肠道毒副作用试验结果。

由图 13 的图 a 可知, 在不影响奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解奥沙利铂引起的结直肠的毒副作用。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠结直肠长度显著缩短, 奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组小鼠结直肠长度显著恢复正常。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 发明所述甘露糖可缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠结直肠的毒副作用。图 13 的图 a 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p < 0.05$, 具差异显著性; **表示 $p < 0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p < 0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p > 0.05$, 没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠结直肠的毒副作用($p < 0.05$)。

由图 13 的图 b 可知, 在不影响奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解奥沙利铂引起的小肠绒毛和隐窝的损伤。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠绒毛数量减少、长度缩短以及小肠隐窝的减少, 奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠小肠绒毛和小肠隐窝显著恢复正常。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 发明所述甘露糖可以缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤。图 13 的图 b 中, 应用 Graphpad prism 9 统计软件对实验数据进行统计分析, 所得实验数据以均数±标准误差表示; 对照组与实验组差异分析采用两因素方差分析及 fisher 检验, *表示 $p < 0.05$, 具差异显著性; **表示 $p < 0.01$, 具差异高度显著性; ***表示 $p < 0.001$, 具差异极其显著性; ns 表示 $p > 0.05$, 没有显著差异。统计分析表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 甘露糖可以缓解化疗药物奥沙利铂引起的小鼠小肠绒毛和隐窝的损伤($p < 0.001$)。

由图 13 的图 c 可知, 在不影响奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 甘露糖可以抑制奥沙利铂引起小肠 GSDME 蛋白的剪切。奥沙利铂组(Oxaliplatin)相较于对照组(Ctrl)小鼠小肠 GSDME 显著剪切, 奥沙利铂+甘露糖共处理组(Oxaliplatin+Mannose)相较于奥沙利铂组(Oxaliplatin)小鼠小肠 GSDME 剪切显著减少。表明在不影响化疗药物奥沙利铂对原发胃癌抑制效果的同时, 发明所述甘露糖处理可以抑制化疗药物奥沙利铂引起小鼠小肠 GSDME 蛋白的剪切。

实施例 7:

甘露糖抑制细胞内 GSDME 介导的细胞焦亡信号通路机制研究

实验方法如下:

1.细胞处理:

除特别描述外, 细胞培养方式与药物处理方式同实施例 1, 其中图 14、图 15、图 16 与图 20 中的 CCCP/FeSO₄ 或 CCCP/FeSO₄+Mannose 表示同时使用 CCCP (羰基氰化氯苯腙)(20 μg/mL, 溶解在 DMSO) 和 FeSO₄ (100 μg/mL, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理, 其中 CCCP/FeSO₄+Mannose 还采用 Mannose(20mM, 溶解在 H₂O)对细胞进行处理; 图 15 中图 c 的 DON 表示使用 DON (6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸) (40 μM, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理; 图 16 中图 b 的 Compound C 表示使用 Compound C (盐酸双吗啡肽) (12.5 μM, 溶解在 1M HCl) 对细胞进行处理; 图 17 中图 c 与图 18 中图 b 中的 GlcN-6P 表示使用 GlcN-6P (6-磷酸氨基葡萄糖) (20 mM, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理, 图 17 中图 c 与图 18 中图 b 中的 GlcNAc-6P 表示使用 GlcNAc-6P (6-磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖) (20 mM, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理, 图 17 中图 c 与图 18 中图 b 中的 GlcNAc-1P 表示使用 GlcNAc-1P (N-乙酰基葡萄糖胺-1-磷酸二钠盐) (20 mM, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理, 图 17 中图 c 与图 18 中图 b 中的 UDP-GlcNAc 表示使用 UDP-GlcNAc (尿苷-5'-二磷酸-N-乙酰基-葡萄糖胺钠盐) (20 mM, 溶解在 H₂O) 对细胞进行处理。其中 GlcN-6P、GlcNAc-6P、GlcNAc-1P 和 UDP-GlcNAc 在处理细胞前应使用链球菌溶血素 O (SLO, 200ng/mL) 提前预处理细胞 10 分钟, 使细胞膜通透性增加, 加快细胞对代谢物摄取。

2.利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因敲除细胞系

首先通过分子克隆技术构建慢病毒骨架 sgRNA 质粒, 然后通过磷酸钙转染的方式进行病毒包装: sgRNA 质粒: 包装质粒 psPAX2 (Addgene): 包装质粒 pMD2.G (Addgene) =4μg:3μg:1μg (6cm 培养皿), 然后转染 HEK293T 细胞来产生慢病毒; 转染 8-12 小时后, 除去培养基, 并加入含有 NEAA 的新鲜温热培养基, 转染 48 小时后收集慢病毒上清液。用慢病毒感染目的细胞 (图 15 中图 b, 图 17 中图 a 与图 20 所使用细胞均为 A375), 并添加 10μg/ml 聚丙烯 (Sigma)。24 小时后, 将细胞用嘌呤霉素 (InvivoGen) 处理 2-3 天。通过免疫印迹法确定敲除效率。维持具有较高敲除效率 (超过 80%) 的嘌呤霉素抗性细胞系用于进一步实验。

其中用于构建 sgRNA 质粒的 DNA 序列如下所示:

对照用质粒: NTC sgRNA 序列 AAATGTCAGGCCGCGCCGTT

图 15 中图 b 与图 17 中图 a 所使用 GFAT1 sgRNA 序列 CTCCGTACACCAATCAACAG

图 15 中图 b 与图 17 中图 a 所使用 GFAT2 sgRNA 序列 TTCAAGAGTGTCCACTACCC

图 16 中图 c 所使用 AMPK α 1 sgRNA 序列 TCCTGTTACAGATTGTATGC

图 16 中图 c 所使用 AMPK α 2 sgRNA 序列 ACGTTATTTAAGAAGATCCG

图 20 所使用 GSDME sgRNA 序列 AGTCTTCATTTGGAACCCTG

其中图 15 中图 b 与图 17 中图 a 所描述“GFAT1/2 sgRNA”表示同时在细胞中敲除蛋白 GFAT1 和 GFAT2; 其中 16 中图 c 所描述“AMPKα1 /α2 sgRNA”表示同时在细胞中敲除蛋白 AMPKα1 和 AMPKα2。

3.蛋白质敲除后回补分析

慢病毒转染法表达蛋白：利用磷酸钙转染法将带有目的基因的过表达质粒（4 μg ，6 cm 培养皿）转染进 HEK293T 细胞来产生慢病毒，将产生的慢病毒收集后，感染上述“2. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因敲除细胞系”中构建完成的对应基因敲除细胞系，获取蛋白质敲除后回补细胞系。图 20 中所描述细胞系为在感染了 GSDME sgRNA 病毒后的细胞系中，再次感染带有第六位苏氨酸突变成谷氨酸（GSDME^{T6E}）的 GSDME 点突变慢病毒所得细胞系。

4.体外磷酸化分析

在 HEK293T 细胞中共表达 AMPK 的三个亚基：带有 Flag 标签的 AMPK α 1(Flag-AMPK α 1)，带有 HA 标签的 AMPK β 1(HA-AMPK β 1)和带有 Myc 标签的 AMPK γ 1(Myc-AMPK γ 1) 蛋白，其中质粒 Flag-AMPK α 1、HA-AMPK β 1 和 Myc-AMPK γ 1 的比例为 4.5 μg :3 μg :3.6 μg （10 cm 培养皿），并用抗 HA 抗体免疫沉淀 AMPK 复合物（AMPK complex）。将免疫沉淀纯化的 AMPK 复合物与细菌表达的带有 GST 标签的 GSDME 蛋白（GST-GSDME）在 100 μl 激酶缓冲液（20 mM HEPES（4-羟乙基哌嗪乙磺酸），pH 7.4；5 mM MgCl₂；1 mM EGTA（乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸）；1 mM DTT（二硫苏糖醇）；1%蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物；200 μM ATP（腺嘌呤核苷三磷酸））在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 分钟。通过加入 SDS 上样缓冲液终止反应，得到磷酸化的 GST-GSDME 样品。然后将反应混合物通过蛋白质印迹确定磷酸化水平变化。

5.质谱分析蛋白磷酸化位点

同上述“3.体外磷酸化分析”实验方法制备磷酸化的 GST-GSDME 样品，将磷酸化的 GST-GSDME 样品（4 μg ）进行 SDS-PAGE 并用考马斯蓝染色。切下 80kDa 左右特异性条带并用胰凝乳蛋白酶消化，然后通过磷酸化质谱分析。

6.液质联用（LC-MS）检测细胞中代谢物水平变化

图 17 中图 b 所描述的不同时间梯度的甘露糖处理完成后的细胞中 GlcNAc-6P 与 GlcNAc-1P 代谢物水平的变化检测方式：用甘露糖处理细胞不同时间后，处理完成后的细胞（ 5×10^6 ）用 PBS（4 $^{\circ}\text{C}$ ）洗涤三次，每个样品中的代谢物用 80%甲醇溶液（1.6mL，-80 $^{\circ}\text{C}$ ）萃取，得到萃取物。将萃取物收集到 2ml 管中，涡旋 1 分钟并在 14000 $\times g$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 分钟。用真空离心机（Labconco Corporation）将上清液蒸发完全。将样品重悬于 200 μl 50%乙腈中。注入每个样品（2 μl ）并用与 UPLC 系统（Waters, ACQUITY UPLC 系统）连接的 QTRAP（SCIEX, QTRAP 6500 plus）质谱仪。该柱是 Luna NH_2 柱（5 μm ，50 $\times$ 2 mm，Phenomenex）。流动相缓冲液 A（pH=9.7）为 20mM NH₄Ac，流动相缓冲液 B 为 100%乙腈。柱和样品的温度分别为 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 10 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 0.3 mL/min 的恒定流速，梯度如下：t=0-1 分钟，90%B；t=15-17 分钟，30%B；t=17-20 分钟，90%B。QTRAP 质谱仪以 MRM 模式以负模式运行，并使用分析标准优化去聚电位和碰撞能量。

7.等温滴定量热法（ITC）分析

使用 MicroCal iTC200 仪器 (GE Healthcare) 在 25° C 下测量 AMPK α 1 与 GlcNAc-6P 之间的结合亲和力和力。将 AMPK α 1 在含有 25 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% 甘油, 2 mM DTT 和 10 mM GSH 溶解之后, 用 PBS 透析蛋白质。同时在 PBS 中制备底物。在滴定实验期间, 细胞中 AMPK α 1 蛋白浓度为 10 μ M, 而作为注射器中底物的 GlcNAc-6P 浓度为 1 mM。

8. 免疫共沉淀技术 (co-IP) 分析

在细胞裂解缓冲液 A (50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1% NP-40, 临用前加 1 mM PMSF 和全酶抑制剂 Cocktail) 中裂解细胞。将细胞裂解物与特异性抗体和蛋白 G-琼脂糖珠 (Millipore) 在 4°C 转动孵育 3 小时。离心收集琼脂糖珠并用细胞裂解缓冲液 A 洗涤三次, 随后通过免疫印迹技术对结果进行分析。对于图 18 中图 b 所描述的 Flag-AMPK α 1 与 HA-LKB1 之间免疫共沉淀的分析, 首先通过慢病毒转染 Flag-AMPK α 1 和 HA-LKB1 进入 A375 细胞内, 用 GlcNAc-6P (6-磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖) (20 mM, 溶解在 H₂O) 处理细胞 6 小时, 随后用 HA 特异性抗体进行免疫沉淀分析。对于图 19 中图 a 所描述的 AMPK α 1 和 GSDME 之间免疫共沉淀的分析, 将细胞裂解物与抗 GSDME 抗体 (Proteintech) 在 4°C 温育过夜, 然后在 4°C 下加入蛋白 G-琼脂糖珠 30 分钟。

结果及结果分析: 结果见图 14~图 20。

甘露糖 (Mannose) 可以抑制黑色素瘤细胞 A375 中, 由羰基氰化氯苯腙 (CCCP) 和 FeSO₄ (一种诱导方式) 诱导的细胞焦亡, 具体表现为细胞鼓泡的现象 (图 14 的图 a), 细胞中 GSDME 蛋白的剪切激活 (图 14 的图 b), 细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放 (图 14 的图 c) 能够被甘露糖抑制住。随后我们对机制展开了研究, 甘露糖进入细胞后的代谢方式如 (图 15 的图 a) 所示, 其中甘露糖会进入到己糖胺代谢通路中, 我们在细胞中同时敲除了 GFAT1 和 GFAT2 (这两个蛋白酶是甘露糖进入己糖胺代谢通路的一个酶, 也是最关键的酶), 发现甘露糖就无法继续抑制 CCCP 和 FeSO₄ 诱导的细胞焦亡 (图 15 的图 b), 同时如果加 DON (一种能够抑制 GFAT1 的蛋白酶活性的药物) 就发现在这种条件下, 甘露糖也不能抑制 CCCP 和 FeSO₄ 诱导的细胞焦亡 (图 15 的图 c), 这就说明甘露糖进入细胞后, 需要进入到己糖胺代谢通路中进行代谢反应才能发挥抑制细胞焦亡的作用。

甘露糖在进入细胞后, 会引起细胞内 AMPK 酶的激活, 体现在 AMPK 的磷酸化水平的升高, 以及其下游底物 ACC 的磷酸化水平的升高 (图 16 的图 a), 我们发现加入 Compound C (AMPK 的蛋白酶活性抑制剂) 后, 甘露糖不能继续抑制 CCCP 和 FeSO₄ 诱导的细胞焦亡 (图 16 的图 b), 同时在细胞中敲除 AMPK α 1 和 AMPK α 2 后, 发现甘露糖也不能继续抑制 CCCP 和 FeSO₄ 诱导的细胞焦亡 (图 16 的图 c), 那就说明甘露糖引起的 AMPK 的激活在它发挥抑制细胞焦亡的功能上是必不可少的。同时发现敲除了 GFAT 后, 甘露糖激活 AMPK 的能力也变弱了 (图 17 的图 a), 证明己糖胺代谢通路也是甘露糖激活 AMPK 的必经之路。

我们通过对甘露糖加入后细胞内的代谢物水平变化进行分析, 发现在细胞内加入甘露糖之后, 会引起

细胞内代谢物 GlcNAc-6P 的浓度显著升高,而作为对照 GlcNAc-1P 的浓度则没有什么变化(图 17 的图 b), GlcNAc-6P 是甘露糖进入到己糖胺代谢通路后产生的一个代谢物,同时我们直接向细胞中加入 GlcNAc-6P 后,也可以引起细胞内 AMPK 的磷酸化水平升高,激活 AMPK,达到加入甘露糖类似的效果(图 17 的图 c)。同时我们还发现 GlcNAc-6P 能够直接与 AMPK 的 α 亚基 AMPK α 1 结合(图 18 的图 a),同时通过免疫共沉淀技术(co-IP)分析发现这种结合还能够增强 AMPK 与其上游激活蛋白 LKB1 的结合(图 18 的图 b),那就证明甘露糖进入细胞后代谢成为 GlcNAc-6P, GlcNAc-6P 可以直接和 AMPK 结合,然后可以增强 AMPK 与其上游蛋白 LKB1 的结合能力,最终增强 AMPK 的激活。

接下来就是对 AMPK 的激活后抑制细胞焦亡的机制进行了探究。我们首先发现 AMPK 与细胞焦亡的关键蛋白 GSDME 能够直接结合(图 19 的图 a),因为 AMPK 最主要的酶活性是其所具有的激酶活性(即磷酸化其他蛋白的能力),我们随后发现 AMPK 能够增强 GSDME 的磷酸化水平(图 19 的图 b),同时我们通过磷酸化质谱的方式检测到 AMPK 会引起 GSDME 的第六位苏氨酸发生较强的磷酸化修饰水平升高(图 19 的图 c),为了探究这种磷酸化修饰的功能,我们发现将 GSDME 的第六位苏氨酸突变成谷氨酸(即 T6E 突变体,是一种在该位点模拟磷酸化的突变体)后,CCCP 和 FeSO₄就无法继续诱导细胞焦亡(图 20),那么就证明甘露糖引起的 AMPK 的激活,会进一步引起 GSDME 蛋白的第六位苏氨酸的磷酸化水平增加,该位点磷酸化水平增加后就会抑制 CCCP 和 FeSO₄ 诱导其剪切激活的能力。

实施例 8:

甘露糖抑制化疗药物顺铂毒副作用机制的验证

实验方法如下:

1.小鼠处理:

(1) 基因修饰小鼠获取: GSDME^{T6E} 小鼠由厦门大学实验动物中心构建。AMPK-DKO 小鼠由林圣彩教授(厦大学生命科学学院细胞应激生物学国家重点实验室)赠送。

(2)将野生型小鼠(WT)及对应 GSDME 第六位苏氨酸模拟点突变小鼠(GSDME^{T6E})分别随机分为 4 组,分别为对照组(Ctrl)、甘露糖组(Mannose)、顺铂组(Cisplatin)、顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin +Mannose);将野生型小鼠(WT)及对应肠道特异性敲除 AMPK 小鼠(AMPK-DKO)分别随机分为 2 组,分别为顺铂组(Cisplatin)、顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin +Mannose)。饲养在 12h 光照, 12h 黑暗环境中。

(3)对照组(Ctrl)小鼠每天用 500 μ L 无菌水进行灌胃处理,甘露糖组和顺铂+甘露糖共处理组小鼠给予甘露糖(溶解于 H₂O 中)灌胃处理,每只小鼠灌胃 20%的甘露糖 500 μ L,每天处理一次,共处理 6 天。

(4) 顺铂组和顺铂+甘露糖共处理组小鼠进行顺铂(溶于 5%葡萄糖溶液中)处理,顺铂采用腹腔注射的方式,在甘露糖处理一天后开始进行处理,剂量为 18mg/kg,甘露糖预处理 1 天后给药 1 次即可。

2.化疗药物副作用检测:

结直肠长度测量，小肠 H&E 组织化学染色分析，小肠和肾脏 GSDME 蛋白剪切检测(检测方法参考实施例 2)。

结果及结果分析：

1. 为了证明甘露糖在发挥抑制正常组织化疗副作用的过程中 AMPK 所发挥的重要作用，我们在小鼠的小肠上皮细胞中敲除了 AMPK 蛋白 (AMPK-DKO)，通过对比 WT 小鼠与 AMPK-DKO 小鼠在顺铂+甘露糖共处理组(Cisplatin +Mannose)的表现可以发现敲除 AMPK 后，甘露糖无法继续抑制化疗药物顺铂对小鼠的结肠 (图 21 的图 a)，小肠产生的损伤 (图 21 的图 b 和图 c)。

2. 为了证明甘露糖在发挥抑制正常组织化疗副作用的过程中 GSDME 蛋白的第六位苏氨酸磷酸化水平的升高所发挥的重要作用，我们构建了 GSDME^{T6E} 的小鼠，通过对比 WT 小鼠与 GSDME^{T6E} 小鼠在顺铂组(Cisplatin)的表现可以发现将第六位苏氨酸带上磷酸化修饰之后，化疗药物对小鼠的正常组织造成的损伤大大降低了 (图 22 和图 23)，那么就证明甘露糖引起的小鼠 GSDME 的第六位苏氨酸磷酸化是其发挥抑制副作用功能的关键。

实施例 9：

甘露糖对 XELOX 治疗方案引起患者肠道损伤的影响

实验方法如下：

1.患者分组和实验设计：

2022 年 4 月至 2022 年 9 月，哈尔滨医科大学附属第一医院收治 8 例诊断为胃肠癌并在术后辅助化疗 (XELOX 方案) 中出现严重腹泻的患者。所有患者均获得书面知情同意书。该研究得到伦理委员会委员会 (2022167) 的批准，并根据赫尔辛基宣言进行。患者包括年龄在 18 至 65 岁之间，均具有接受 XELOX 方案后腹泻的阳性病史。如果患者接受靶向治疗或免疫治疗，改变化疗方案，未能完成化疗过程，则排除患者。符合条件的患者在两个随机但连续的 XELOX 方案周期 (每个周期 21 天) 中入组。在前一个周期中，患者接受常规 XELOX 方案 (作为对照)；在后一个周期中，相同的患者从接受 XELOX 方案的第 1 天开始每天一次口服 500 mg 甘露糖 (NOW Foods)，直到化疗周期完成的第 21 天。在这些连续的化疗周期中每天记录排便次数。在第 21 天收集并评估患者血液和粪便。

结果及结果分析：结果见图 24 的图 a 和图 24 的图 b。通过对 8 名患有胃癌或结直肠癌且正在接受化疗的患者进行临床试验，我们发现当患者正常接受化疗时，会产生较为强烈的副作用，如腹泻 (每日排便次数增加)，肠炎 (粪便中白细胞的数目增加)，化疗的同时服用甘露糖可以明显减弱化疗药物产生的副作用 (图 24 的图 a，图 24 的图 b)。

本发明的方法已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在本发明内容、精神和范围内对本文

所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明内。

权 利 要 求 书

1. 甘露糖在制备抑制细胞焦亡或减轻化疗药物毒副作用的药物、试剂盒、药物组合物或保健品中应用，所述毒副作用为器官损伤。
2. 如权利要求 1 所述应用，其特征在于所述器官为肠道或肾脏。
3. 如权利要求 1 所述应用，其特征在于所述化疗药物为顺铂、卡铂、奥沙利铂、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、白消安、氮芥、苯丁酸氮芥、塞替派、卡莫司汀、尼莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、培美曲塞、甲氨蝶呤、氟脲嘧啶、卡培他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、阿柔比星、伊达比星、博来霉素、丝裂霉素、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、喜树碱、伊立替康、托泊替康、紫杉醇、多西紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇脂质体、依托泊苷、替尼泊苷、丙卡巴肼、达卡巴嗪、替莫唑胺、L-门冬酰胺酶、去甲斑蝥素、甲基斑蝥素，或其药学上可接受的盐中的至少一种。
4. 如权利要求 1 所述应用，其特征在于所述药物制成以下剂型：片剂、胶囊、粒剂或注射液。
5. 如权利要求 1 所述应用，其特征在于所述药物组合物包含甘露糖，或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。
6. 如权利要求 1 所述应用，其特征在于所述试剂盒包括：(i) 包含甘露糖的试剂，和(ii) 包含化疗药物的试剂。
7. 甘露糖在制备用于抑制化疗药物诱导正常肠和肾细胞焦亡的药物中应用。
8. 甘露糖在制备用于缓解化疗药物导致肠道毒副作用的药物中应用。
9. 甘露糖在制备用于缓解化疗药物导致肾脏毒副作用的药物中应用。
10. 如权利要求 7~9 中任一项所述应用，其特征在于所述药物还包含有效量的化疗药物。

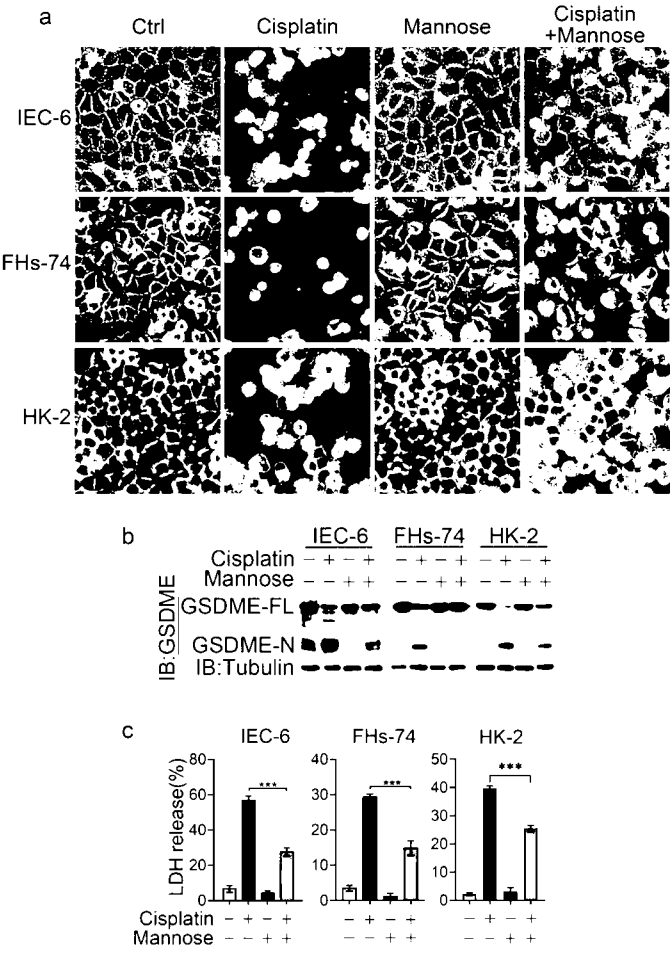


图 1

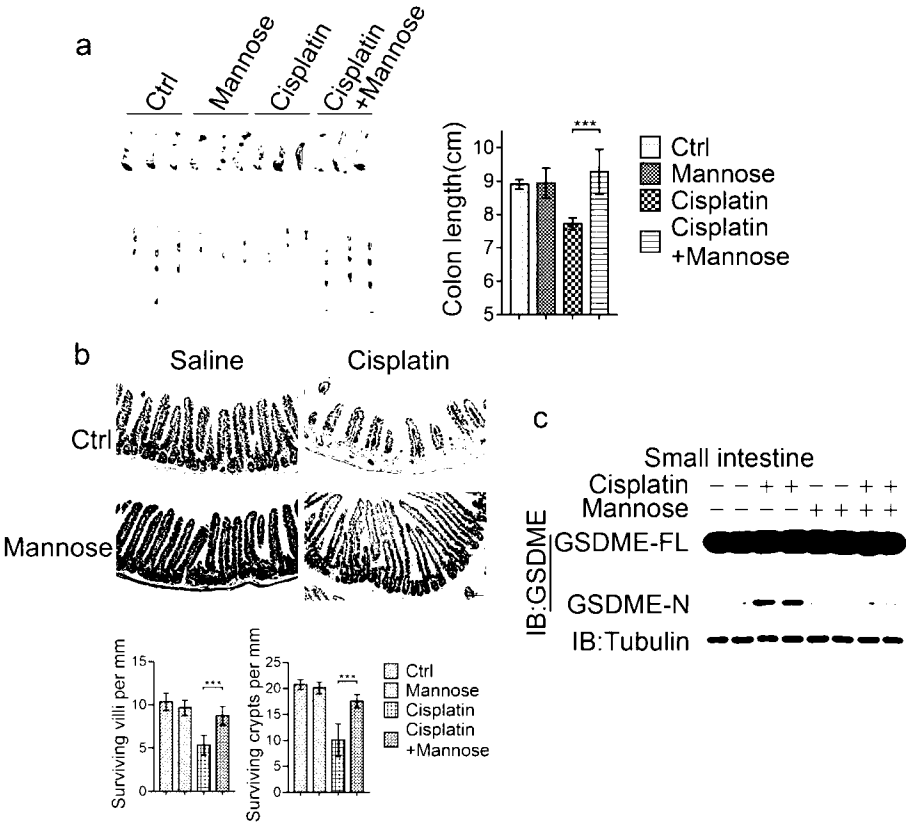


图 2

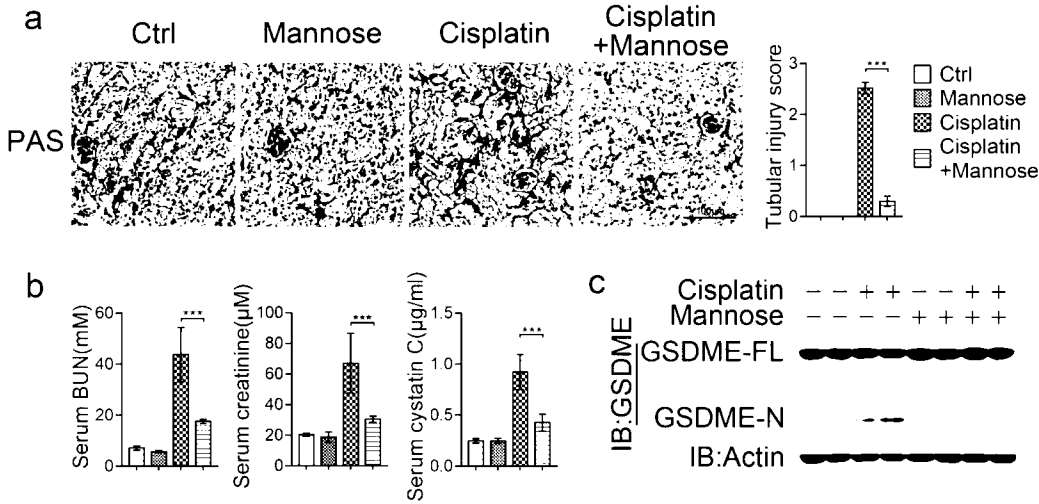


图 3

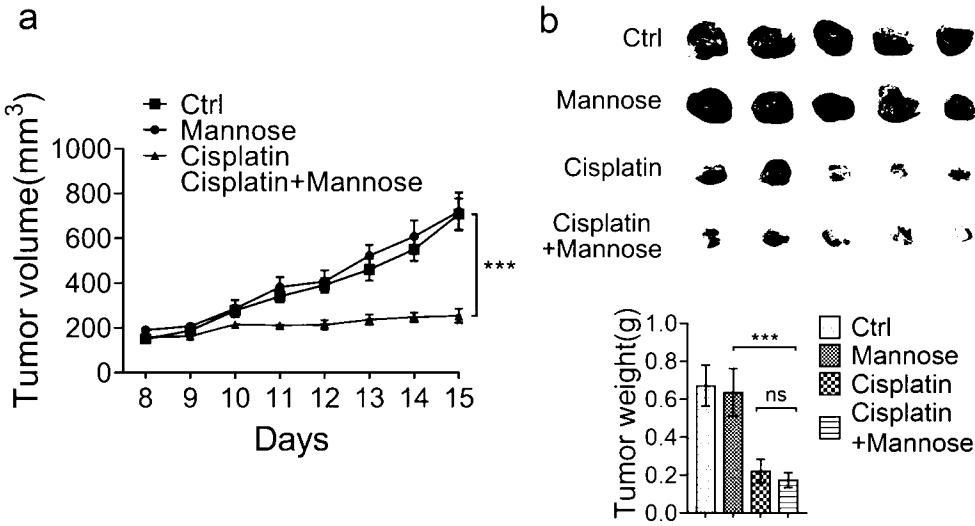


图 4

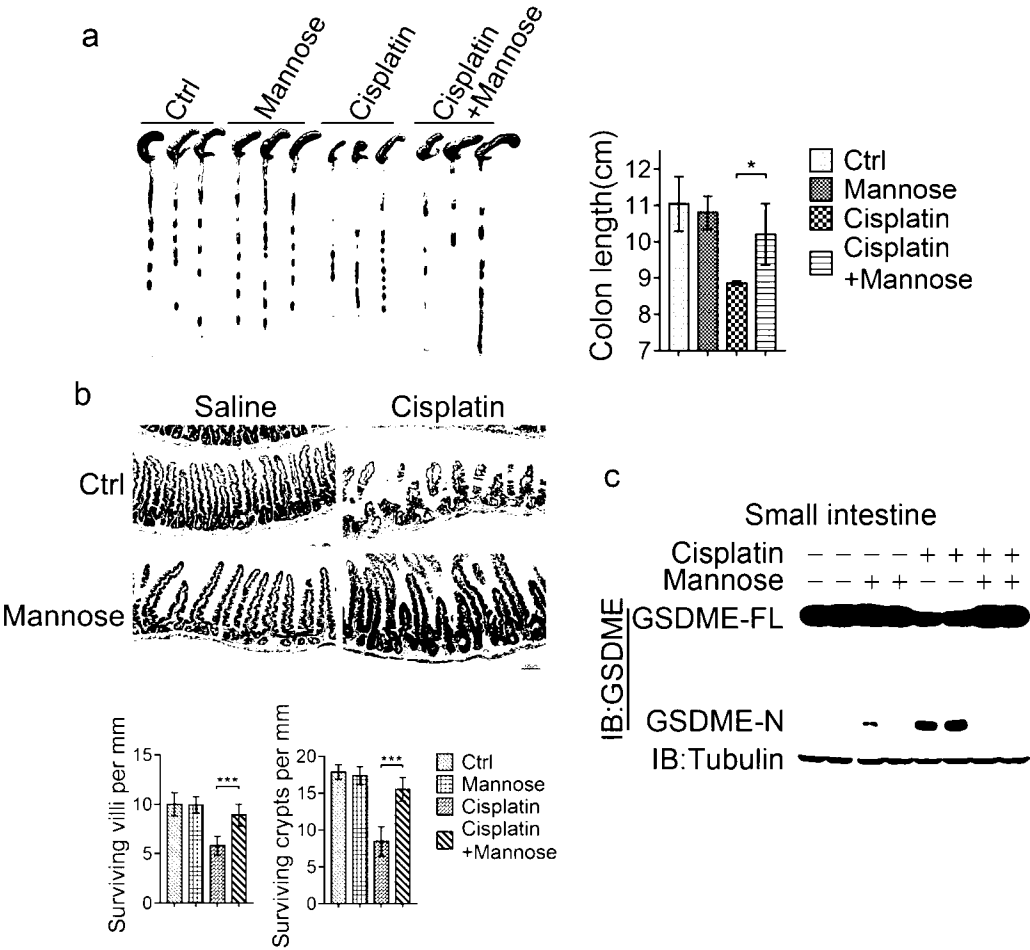


图 5

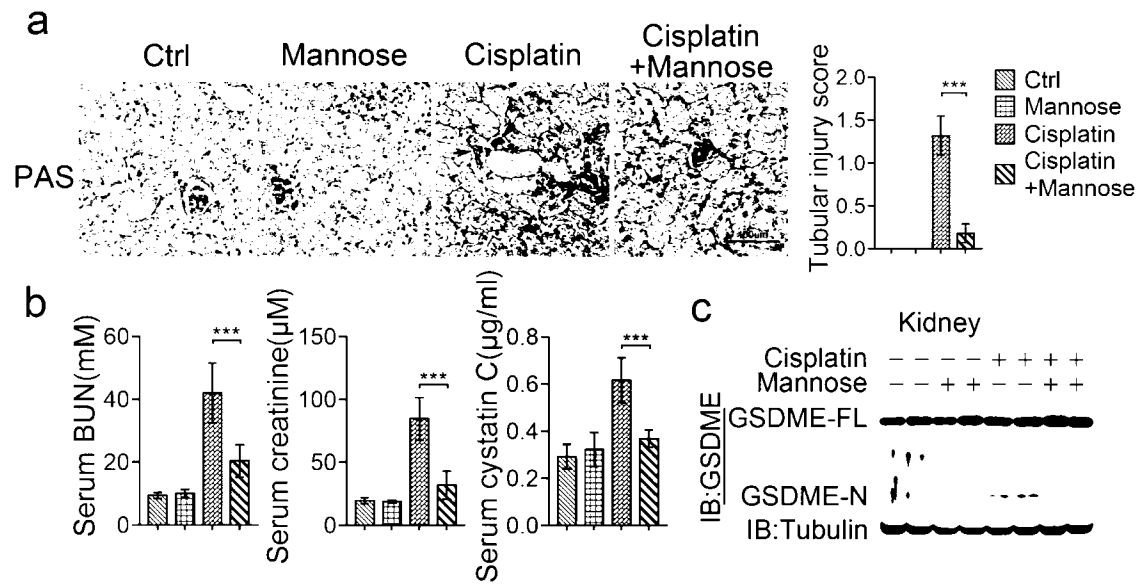


图 6

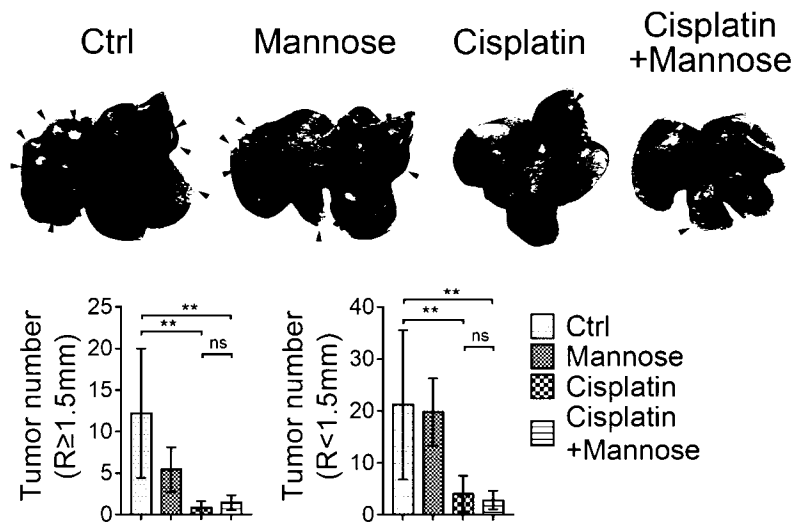


图 7

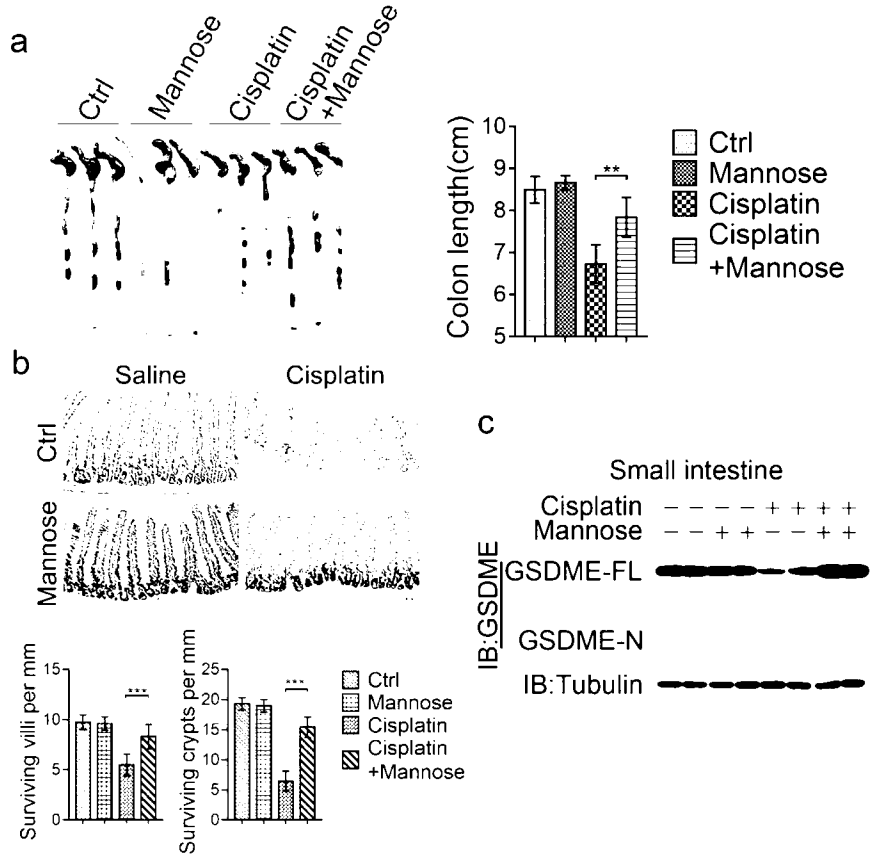


图 8

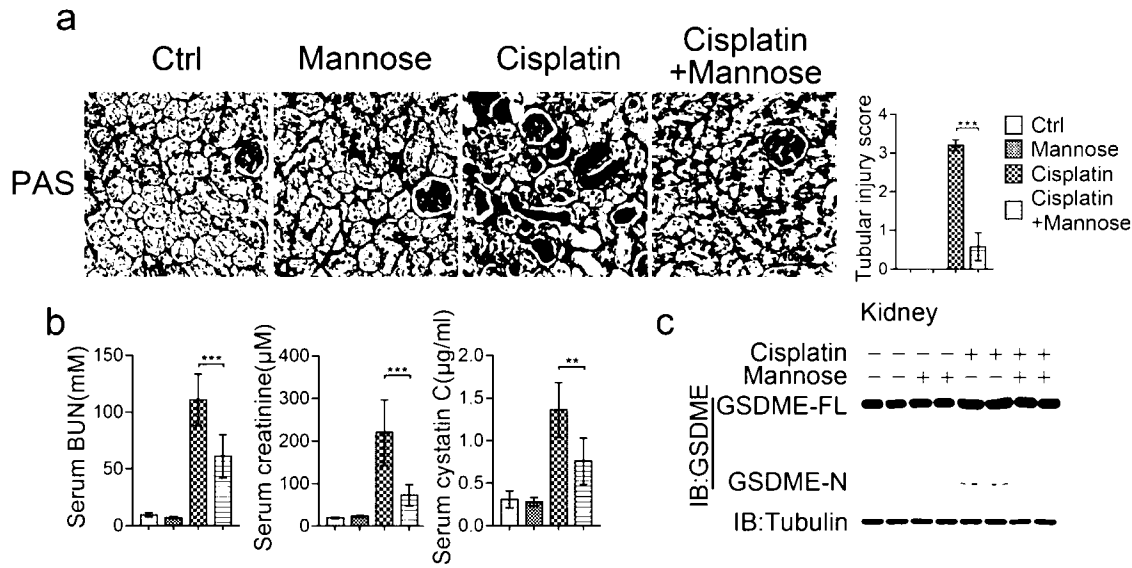


图 9

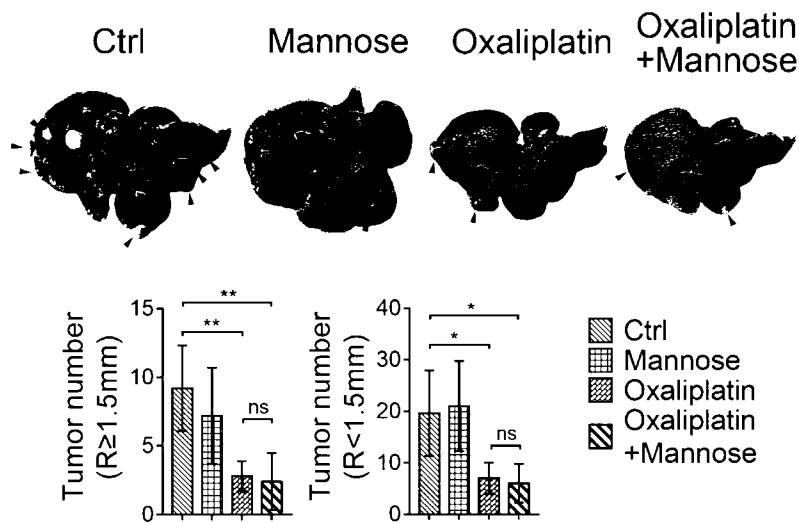


图 10

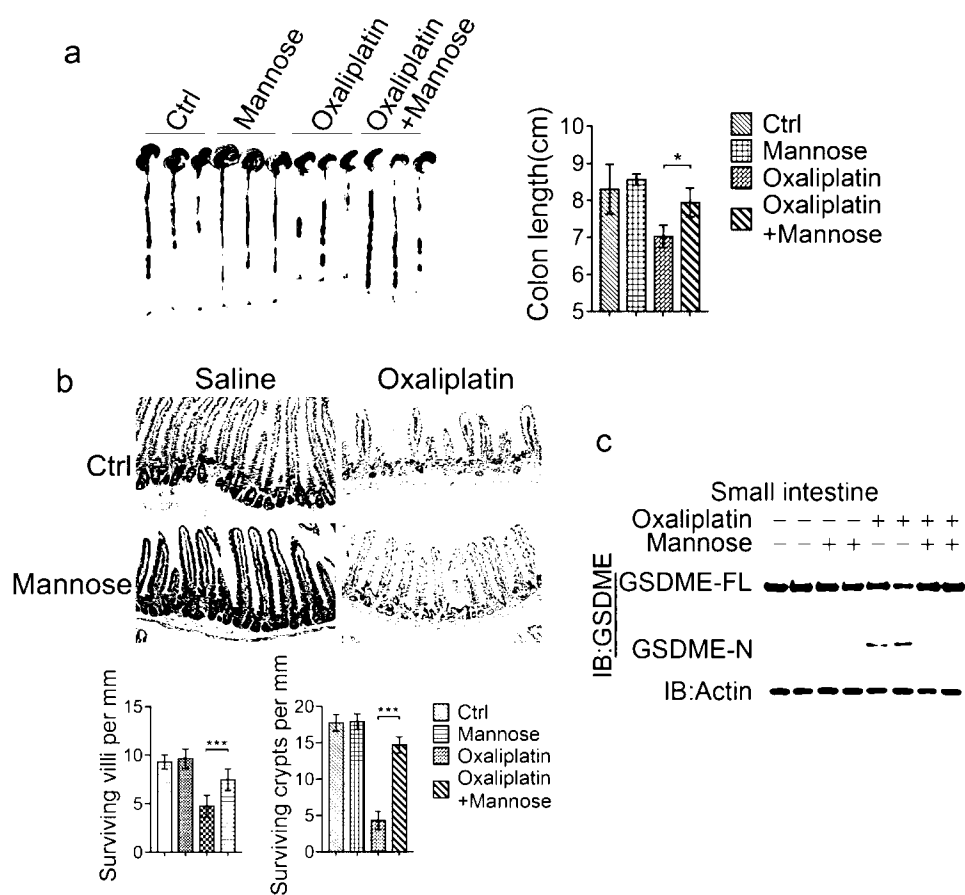


图 11

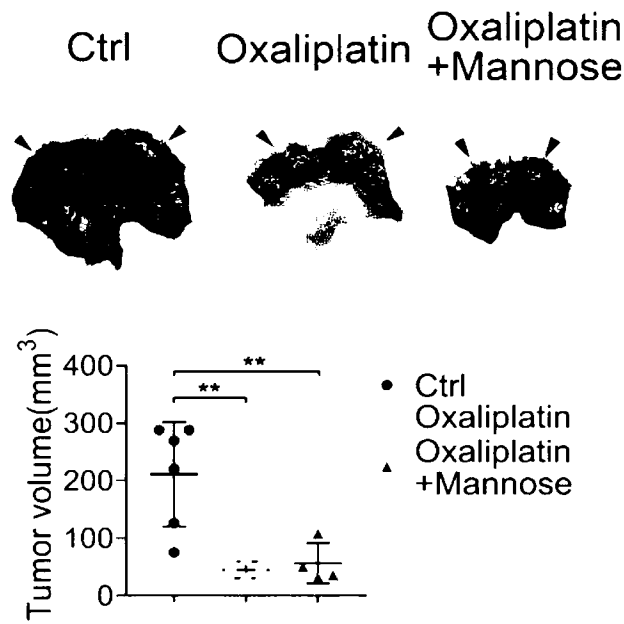


图 12

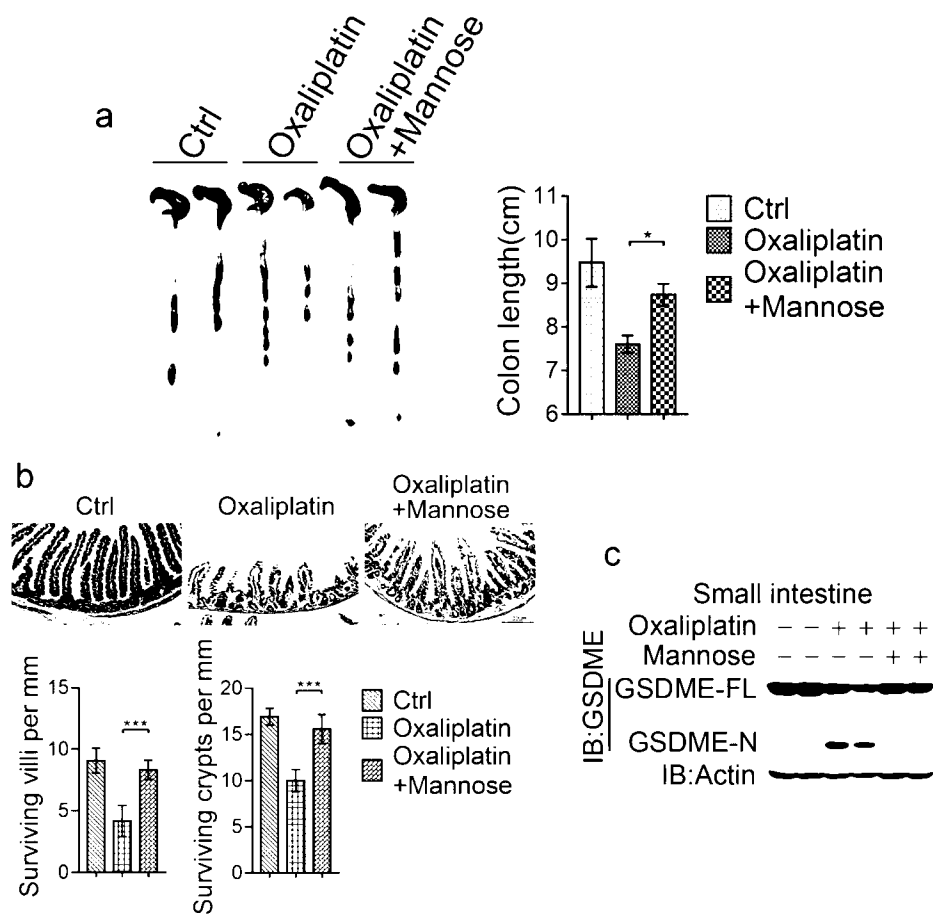


图 13

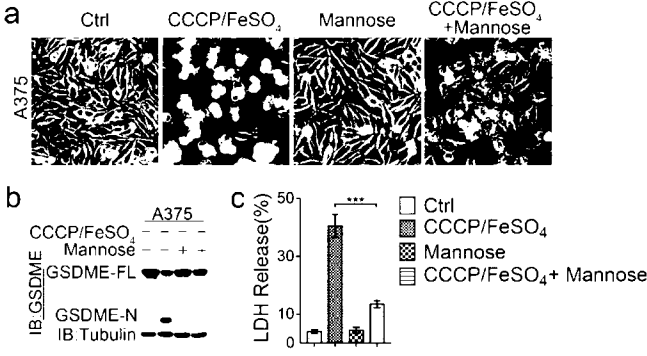


图 14

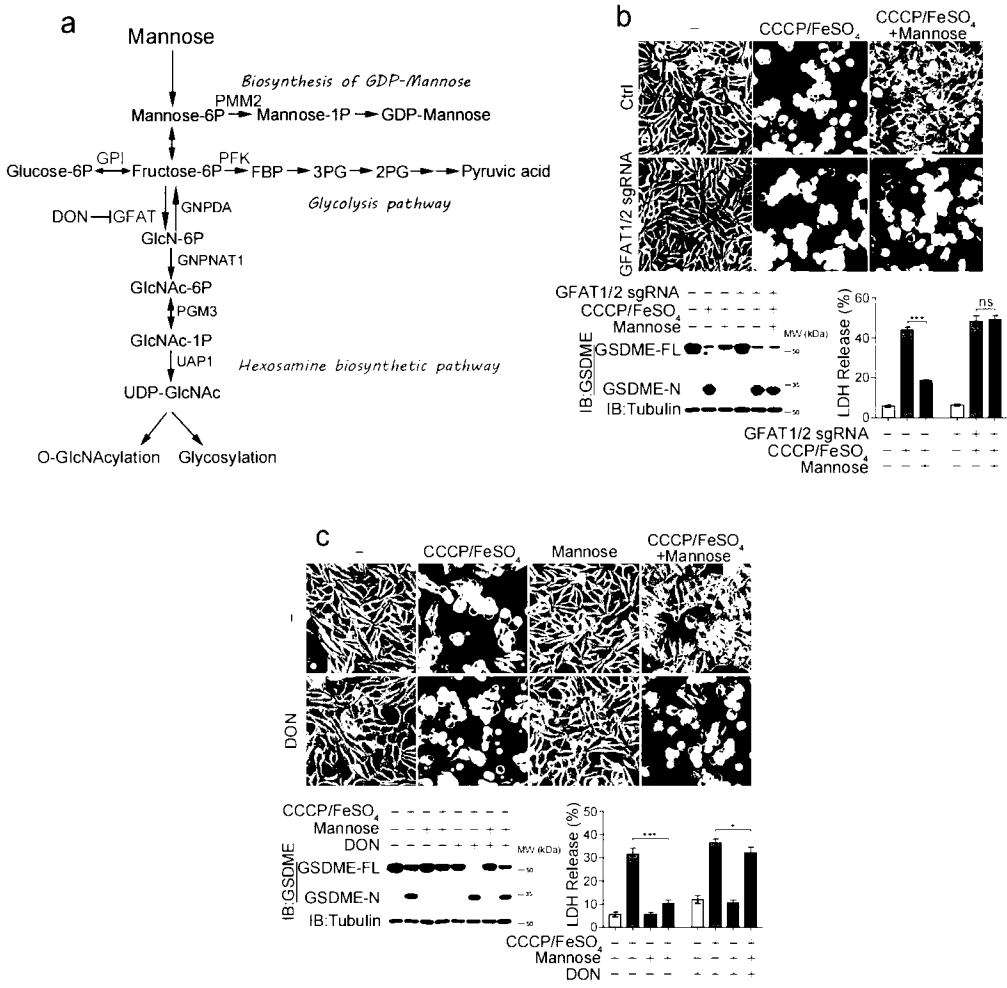


图 15

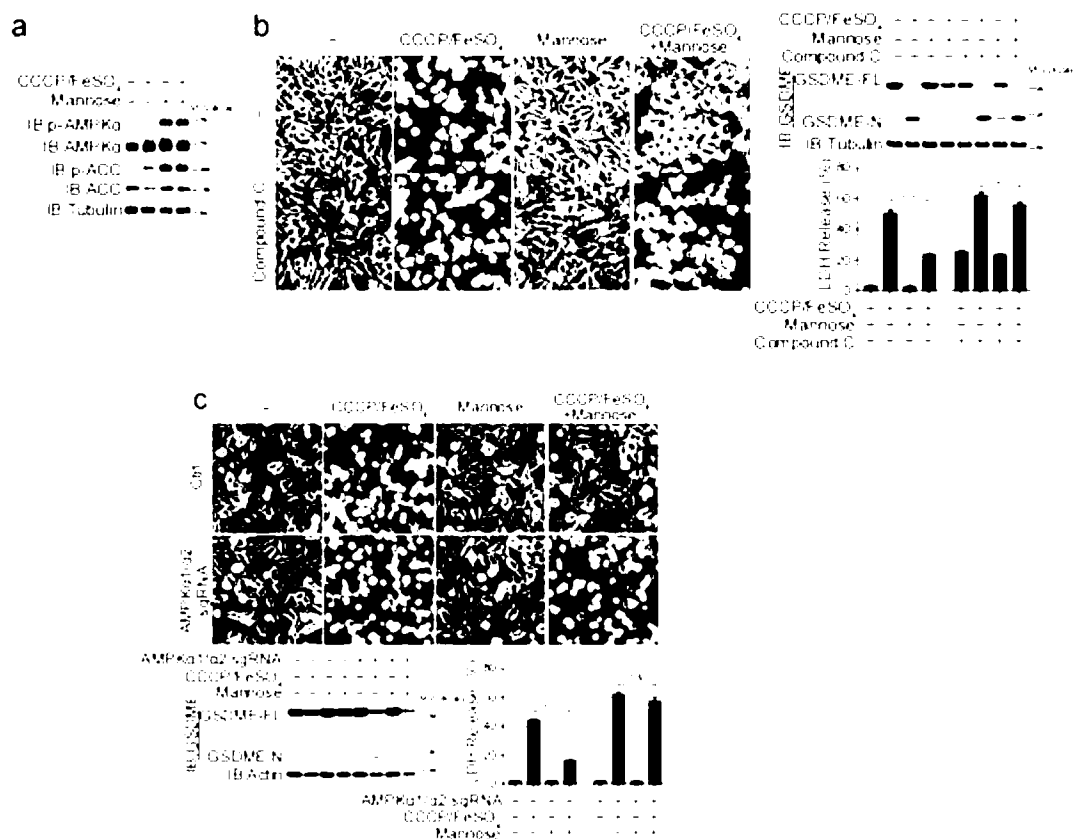


图 16

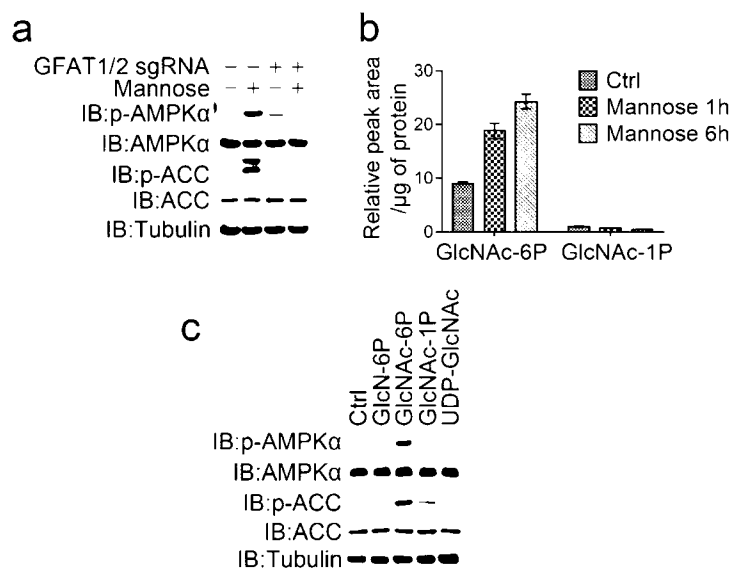


图 17

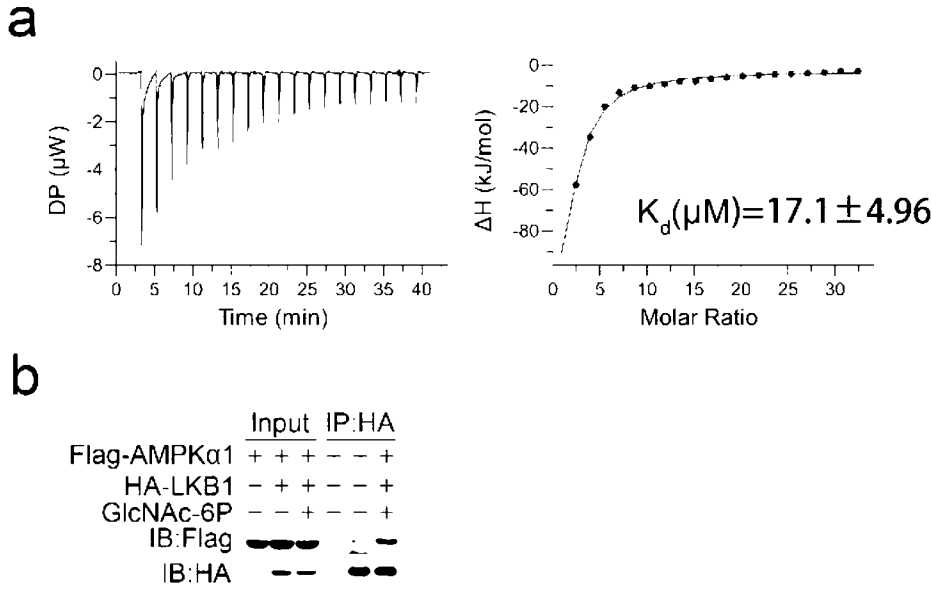


图 18



图 19

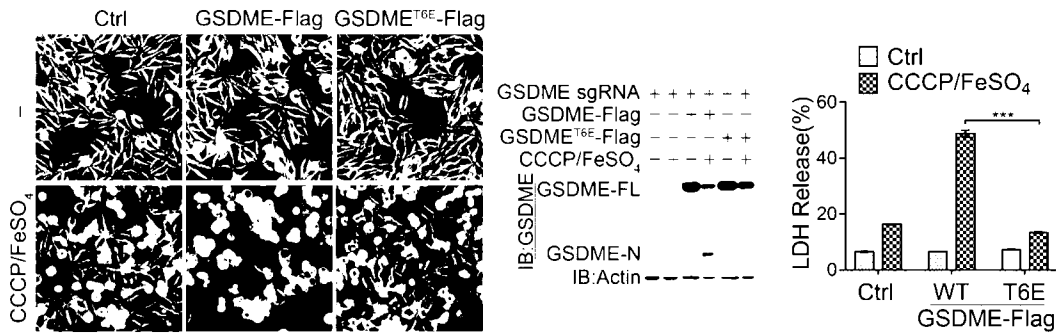


图 20

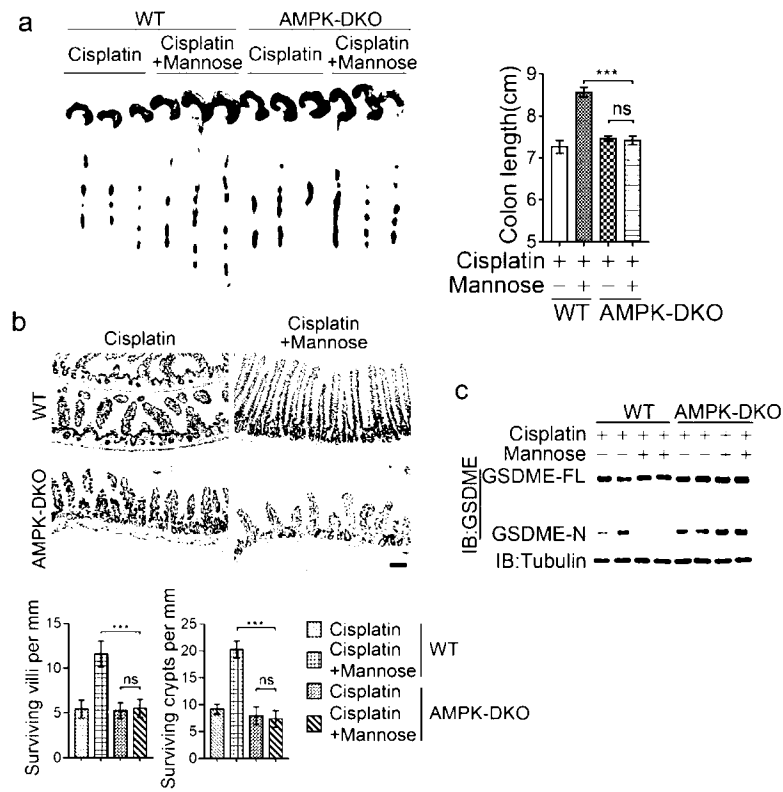


图 21

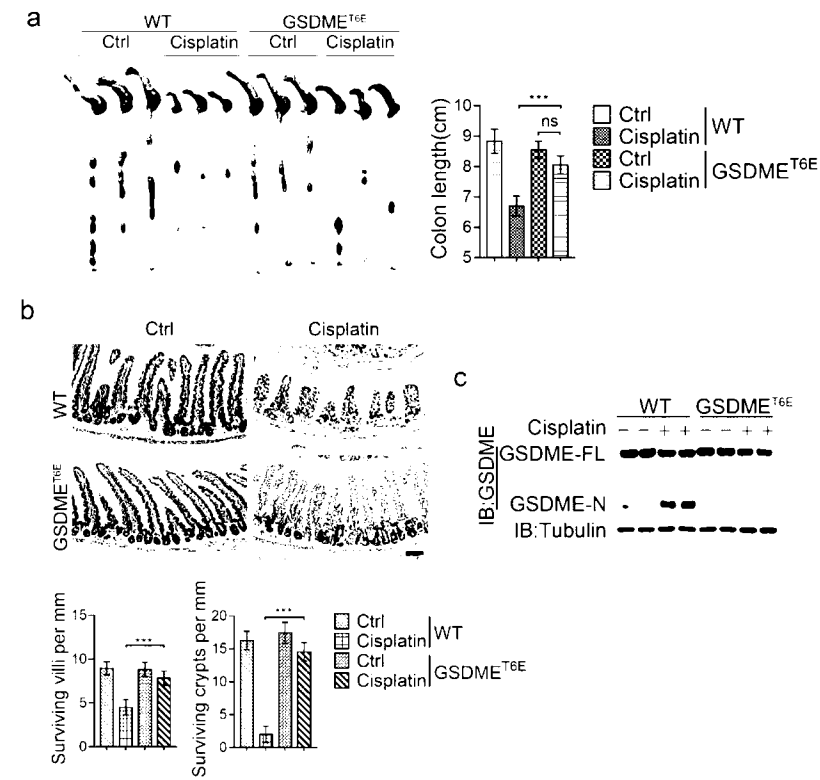


图 22

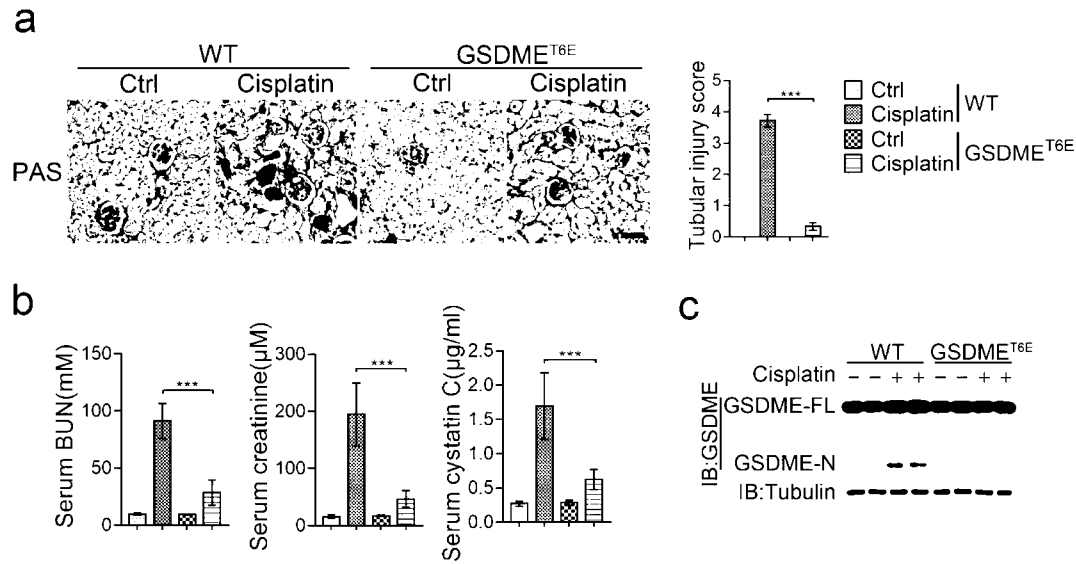


图 23

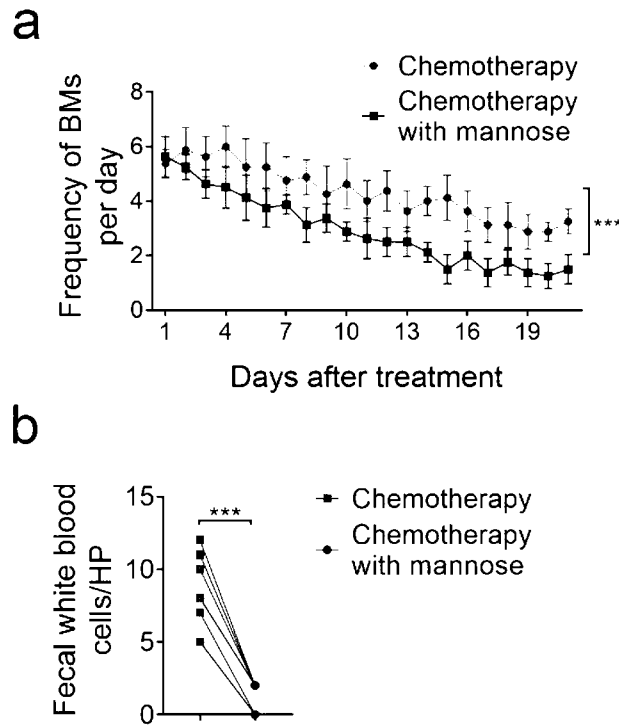


图 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/093225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7004(2006.01)i; A61P13/12(2006.01)i; A61P1/00(2006.01)i; A61P39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:A61K; C08B; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CJFD, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VEN, WPABSC, STN REGISTRY, STN CAPLUS, PUBMED, ELSEVIER, 必应, CNKI: 甘露糖, 细胞焦亡, 凋亡, 甘露吡喃糖, 化疗, 副作用, 抗癌药, 不良反应, 毒性, 副反应, 肠损伤, pyroptosis, apoptosis, Mannose, 46032-76-2, 3458-28-4, toxic, side effects, chemotherapeutic, cisplatin, carboplatin, intestinal injury

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114903908 A (XIAMEN UNIVERSITY) 16 August 2022 (2022-08-16) claims 1-10	1-10
PX	CN 116077512 A (XIAMEN UNIVERSITY) 09 May 2023 (2023-05-09) description, paragraphs 4-10	1-10
X	谢晨等 (XIE, Chen et al.). "D-甘露糖对炎性条件下牙龈间充质干细胞 迁移, 增殖和凋亡的影响 (Effect of D-Mannose on Migration, Proliferation and Apoptosis of Gingival Mesenchymal Stem Cells Under Inflammatory Conditions)" <i>北京口腔医学 (Beijing Journal of Stomatology)</i> , Vol. 29, No. 4, 28 August 2021 (2021-08-28), pp. 207-212 ISSN: 1006-673X, abstract	1, 4-5
X	MA, Jing et al. "Glycosylated platinum(IV) prodrugs demonstrated significant therapeutic efficacy in cancer cells and minimized side-effects" <i>Dalton Transactions</i> , Vol. 45, 20 June 2016 (2016-06-20), pp. 11830-11838 ISSN: 1477-9226, abstract, page 11833, left column, paragraph 4	1, 3-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2023

Date of mailing of the international search report

30 August 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/093225

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEI, Zewei et al. "Mannose: Good player and assister in pharmacotherapy" <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i> , Vol. 129, 18 June 2020 (2020-06-18), pages 1-6 ISSN: 0753-3322, page 2, left column, paragraph 2 to page 3, right column, paragraph 2	1, 3-6
X	XU, Xuanli et al. "Mannose prevents acute lung injury through mannose receptor pathway and contributes to regulate PPAR γ and TGF- β 1 level" <i>Int J Clin Exp Pathol</i> , Vol. 8, No. 6, 15 June 2015 (2015-06-15), pp. 6214-6224 ISSN: 1936-2625, abstract	1, 4-5
A	CN 109512857 A (SHANDONG HANTAI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 March 2019 (2019-03-26) description, paragraph 17	1-10
A	CN 113121718 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 16 July 2021 (2021-07-16) description, paragraphs 8-17	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/093225

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114903908	A	16 August 2022	None			
CN	116077512	A	09 May 2023	None			
CN	109512857	A	26 March 2019	None			
CN	113121718	A	16 July 2021	CN	113121718	B	23 September 2022

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/093225

A. 主题的分类

A61K 31/7004(2006.01)i; A61P13/12(2006.01)i; A61P1/00(2006.01)i; A61P39/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:A61K; C08B; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CJFD, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VEN, WPABSC, STN REGISTRY, STN CAPLUS, PUBMED, ELSEVIER, 必应, CNKI: 甘露糖, 细胞焦亡, 凋亡, 甘露吡喃糖, 化疗, 副作用, 抗癌药, 不良反应, 毒性, 副反应, 肠损伤, pyroptosis, apoptosis, Mannose, 46032-76-2, 3458-28-4, toxic, side effects, chemotherapeutic, cisplatin, carboplatin, intestinal injury

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114903908 A (厦门大学) 2022年8月16日 (2022 - 08 - 16) 权利要求1-10	1-10
PX	CN 116077512 A (厦门大学) 2023年5月9日 (2023 - 05 - 09) 说明书第4-10段	1-10
X	谢晨 等. "D-甘露糖对炎性条件下牙龈间充质干细胞 迁移、增殖和凋亡的影响" 北京口腔医学, 第29卷, 第4期, 2021年8月28日 (2021 - 08 - 28), 第207-212页 ISSN: 1006-673X, 摘要	1, 4-5
X	Jing Ma 等. "Glycosylated platinum(IV) prodrugs demonstrated significant therapeutic efficacy in cancer cells and minimized side-effects" Dalton Transactions, 第45卷, 2016年6月20日 (2016 - 06 - 20), 第11830 - 11838页 ISSN: 1477-9226, 摘要, 第11833页左栏第4段	1, 3-6

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年8月22日

国际检索报告邮寄日期

2023年8月30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

陈振中

电话号码 (+86) 020-28957133

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Zewei Wei 等. "Mannose: Good player and assister in pharmacotherapy" Biomedicine & Pharmacotherapy, 第129卷, 2020年6月18日 (2020 - 06 - 18), 第1-6 页 ISSN: 0753-3322, 第2页左栏第2段-第3页右栏第2段	1, 3-6
X	Xuan-Li Xu 等. "Mannose prevents acute lung injury through mannose receptor pathway and contributes to regulate PPAR γ and TGF- β 1 level" Int J Clin Exp Pathol, 第8卷, 第6期, 2015年6月15日 (2015 - 06 - 15), 第6214-6 224页 ISSN: 1936-2625, 摘要	1, 4-5
A	CN 109512857 A (山东汉泰生物科技有限公司) 2019年3月26日 (2019 - 03 - 26) 说明书第17段	1-10
A	CN 113121718 A (东南大学) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 说明书第8-17段	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/093225

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	114903908	A	2022年8月16日	无	
CN	116077512	A	2023年5月9日	无	
CN	109512857	A	2019年3月26日	无	
CN	113121718	A	2021年7月16日	CN 113121718 B	2022年9月23日