



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117202900 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280022392.4

(22) 申请日 2022.01.18

(30) 优先权数据

21382036.8 2021.01.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/051038 2022.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/152943 EN 2022.07.21

(71) 申请人 瓦伦西亚大学

地址 西班牙瓦伦西亚

申请人 瓦伦西亚社区拉菲理工学院和大学
医院研究基金会

(72) 发明人 J·M·埃斯特拉·阿里格尔

M·E·欧布拉多·帕拉

M·R·萨尔瓦多·帕尔默

A·蒙托罗·帕斯特

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 陈习 郑元博

(51) Int.Cl.

A61K 31/05 (2006.01)

权利要求书3页 说明书36页 附图13页

(54) 发明名称

用于预防、改善或减少辐射诱发的疾病的紫
檀芪和水飞蓟宾

(57) 摘要

本发明涉及包含紫檀芪或其药学上可接受的
的盐与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐组合的
组合物,及其用于治疗、预防、改善或减少对象中
电离辐射诱发的疾病的用途。该组合物和该用途
还可以包含至少一种或多种辐射缓和剂化合物,
优选NAD⁺加强剂和/或FSL-1。

1. 一种组合物, 包含a) 紫檀芪或其盐, 和b) 水飞蓟宾或其盐。
2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述组合物还包含至少一种或多种辐射缓和剂化合物, 所述辐射缓和剂化合物优选地选自:
 - a. NAD⁺加强剂, 和/或
 - b. 成纤维细胞刺激性脂肽-1, 或其任何盐。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物, 其中所述组合物还包含至少两种或更多种辐射缓和剂化合物, 其中所述至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽-1、或其任何盐。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物, 其中所述紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐, 和/或其中所述水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2', 3-二氢琥珀酸二钠盐。
5. 根据权利要求3或4所述的组合物, 其中所述NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是药物组合物、营养品组合物、化妆品组合物或食品组合物。
7. 用于预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的紫檀芪或其药学上可接受的盐, 其与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐组合, 其中施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行; 并且其中所述组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。
8. 根据权利要求7所述的用途的紫檀芪, 其中紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以单一药物组合物或分开的药物组合物施用。
9. 根据权利要求7或8中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐的施用是局部、口服或肠胃外施用。
10. 根据权利要求7至9中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中将紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐在辐射之前和/或之后或两者, 同时或依次施用数次。
11. 根据权利要求7至10中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述组合的用量能够提供辐射防护作用。
12. 根据权利要求7至11中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述用途还包括与至少一种或多种辐射缓和剂化合物组合施用, 其中所述组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐、和c) 至少一种或多种辐射缓和剂化合物或其任何药学上可接受的盐。
13. 根据权利要求12所述的用途的紫檀芪, 其中所述至少一种或多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和/或成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。
14. 根据权利要求13所述的用途的紫檀芪, 其中所述用途还包括与至少两种或更多种辐射缓和剂化合物组合施用, 其中所述至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。
15. 根据权利要求12至14中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。
16. 根据权利要求7至15中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述电离辐射诱发的疾病

与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。

17. 根据权利要求7至16中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述电离辐射诱发的疾病是急性辐射综合征和/或慢性辐射综合征。

18. 根据权利要求7至17中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述电离辐射是 γ 射线或X射线。

19. 根据权利要求7至18中任一项所述的用途的紫檀芪, 其中所述紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐, 和/或其中所述水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2', 3-二氢琥珀酸二钠盐。

20. 紫檀芪或其盐与水飞蓟宾或其盐组合的非治疗性美容用途, 其中所述组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。

21. 根据权利要求20所述的非治疗性美容用途, 其中所述用途是防护、改善和/或减少阳光对人皮肤和嘴唇的不利影响, 例如老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皲裂、松弛、变薄、毛孔粗大。

22. 用于增加有此需要的患者中去乙酰化酶的细胞内水平的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述增加是与在用紫檀芪或其盐与水飞蓟宾或其盐的组合治疗之前同一患者中去乙酰化酶的细胞内水平相比增加。

23. 根据权利要求22所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述有此需要的患者是患有神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症的患者。

24. 根据权利要求23所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述病症选自由以下组成的列表: 阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病。

25. 用作营养品组合物的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。

26. 根据权利要求25所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中用作营养品组合物的用途是用于治疗或预防电离辐射诱发的疾病, 用于治疗或预防神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症, 和/或用于防护或修复阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响。

27. 根据权利要求26所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。

28. 根据权利要求25所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症选自由以下组成的列表: 阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病。

29. 根据权利要求25所述的用途的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐, 其中所述阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响选自由以下组成的列表: 老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皲裂、松弛、变薄、毛孔粗大、脂肪团形成、痤疮形成、红斑痤疮、银屑病和湿疹。

30. 多部分试剂盒,包括至少两个容器,所述至少两个容器包含至少紫檀芪或其盐和水飞蓟宾或其盐、以及任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物。

31. 根据权利要求30所述的多部分试剂盒,其中所述任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物选自以下的组:

- a. NAD⁺加强剂,和/或
- b. 成纤维细胞刺激性脂肽,
或其任何药学上可接受的盐。

32. 根据权利要求31所述的多部分试剂盒,其中所述NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

33. 根据权利要求27至28中任一项所述的多部分试剂盒,其中所述紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或其中所述水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3'-二氢琥珀酸二钠盐。

用于预防、改善或减少辐射诱发的疾病的紫檀芪和水飞蓟宾

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域。具体地,本发明涉及用于预防、改善或减少辐射诱发的疾病的组合物和方法领域。

背景技术

[0002] 如今,电离辐射用于各种医疗目的。X射线和 γ 射线主要通过DNA和其他细胞靶标的直接电离以及活性氧(ROS)的间接作用而损伤细胞。 γ 射线和X射线之间的区别在于它们的产生方式。 γ 射线源自放射性核素受激原子核经历放射性衰变后的沉降过程,而X射线则在电子撞击靶标或电子在原子内重新排列时产生。X射线和 γ 射线都是高能(高频)电磁辐射。它们是不带电荷或质量的能包(光子)。X射线和 γ 射线具有相同的特性和健康作用。

[0003] 包括X射线和 γ 射线在内的电磁辐射通过DNA和其他分子的电离直接损伤细胞,也通过产生活性氧间接损伤细胞。对辐射暴露的反应取决于细胞类型和辐射剂量、固有的组织敏感性和修复以及调节细胞内因素,包括细胞周期状态、 O_2 压力以及硫醇和其他抗氧化剂的水平。然而,辐射防护和缓和策略稀缺且效率低下。每年,数以百万计的癌症患者在治疗过程中接受放疗,近年来一些放射性事件或核事件对人们构成威胁,因此需要辐射防护或缓和策略。

[0004] 几十年来,开发针对有害辐射暴露的防护剂一直是深入研究的主题。目前还没有有效且安全的辐射防护剂。迄今为止,还没有开发出用于治疗高水平电离辐射暴露(例如导致急性造血和胃肠道辐射综合征(ARS)的电离辐射暴露)的药物。

[0005] 辐射防护剂是可以减少辐射造成的直接损伤的化合物。辐射缓和剂是即使在已释放辐射后也能够将毒性降至最低的化合物。一般来说,理想的辐射防护剂或辐射缓和剂应该是稳定的,同时能够易于给药,没有相关毒性,并且应该保护正常组织,所述正常组织被认为是敏感的,使得这些组织中的急性或晚期毒性要么是剂量限制性的,要么是导致生活质量显著下降的原因(导致例如粘膜炎、肺炎、脊髓病、口干症、直肠炎、纤维化或脑白质病)。

[0006] 多种植物化学物质(植物产生的化合物,通常帮助它们茁壮成长或阻止竞争者、捕食者或病原体)是抗氧化剂,因此具有潜在的辐射防护作用。然而,它们的辐射防护或辐射缓和特性通常在短时间内有效,通常仅限于辐射发生后最多一个月。因此,需要能够在持续的时间段内治疗、减少、预防或改善辐射对对象的有害影响的新化合物和组合物。

[0007] 本发明提供了用于长期防护和缓和由辐射暴露引起的疾病的组合物及其用途。

附图说明

[0008] 图1.A)接受全身 γ 辐照的瑞士白化小鼠的30天存活测试的辐射剂量反应,B)用 γ 射线(LD50/30)和不同剂量的紫檀芪(PT)处理的小鼠的60天存活情况。氨磷汀用作经批准的辐射防护剂对照,C)用 γ 射线(LD50/30)和不同剂量的白藜芦醇(Resv)处理的小鼠的60天存活情况。口服施用化合物。在所有情况下,每组使用二十只小鼠。

[0009] 图2. 紫檀芪 (PT) 与其他多酚的组合在辐照后A) 6天、B) 30天和C) 60天预防 γ 辐射 (LD50/30) 诱发的致死率。每种植物化学物质的剂量选自己公布的最大无毒剂量。口服施用化合物。在所有情况下, 每组使用二十只小鼠。

[0010] 图3. A) 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 组合对接受全身 γ 辐照 (LD50/30) 的小鼠长期存活的影响。B) PT和SIL组合引起辐射防护: 对在 γ 辐照之前或之后施用多酚之间的比较。腹膜内施用化合物。在所有情况下, 每组使用二十只小鼠。

[0011] 图4. A) 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 对 γ 辐照 (LD50/30) 小鼠的存活的影响以及对体重的影响。B) PT和SIL给药对小鼠全身 γ 辐射诱导的神经运动功能改变的影响。经腹膜内施用化合物。在所有情况下, 每组使用二十只小鼠。

[0012] 图5. 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 对分离细胞中不同抗氧化防御相关酶活性的 γ 辐射诱导的氧化损伤表达 (RT-PCR) 的保护作用。GCL, γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶; GPX, 谷胱甘肽过氧化物酶; CAT, 过氧化氢酶; SOD, 超氧化物歧化酶; EIC, 肠上皮细胞。相比对照 (未处理) 细胞的表达率的倍数变化 (每种分子、细胞类型和处理, $n=5$)。

[0013] 图6. 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 对不同分子标志物的 γ 辐射诱导的氧化损伤的保护作用。A) 8-OHdG, B) 8-异前列腺烷和C) 蛋白质羰基 (每种分子、细胞类型和处理, $n=5$)。

[0014] 图7. A) γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶, B) 谷胱甘肽中, 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 对谷胱甘肽相关抗氧化防御的 γ 辐射诱导的氧化损伤的保护作用 (每种分子、细胞类型和处理, $n=5$)。

[0015] 图8. 紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 对不同抗氧化防御相关酶活性的 γ 辐射诱导的氧化损伤的保护作用: A) 过氧化氢酶, B) 谷胱甘肽过氧化物酶, 以及C) 和D) 超氧化物歧化酶1和2 (每种分子、细胞类型和处理, $n=5$)。

[0016] 图9. 烟酰胺核苷 (NR) 和成纤维细胞刺激性脂肽 (FSL-1) 对 γ 辐照 (LD50/30) 诱发的死亡率的影响。NR每天施用, 持续30天, 每天一次单剂量 (口服), 并在辐照后 (60分钟) 立即开始。FSL-1仅在辐照后24小时腹膜内施用一次。在所有情况下, 每组使用二十只小鼠。

[0017] 图10. 经处理的辐照小鼠的循环血液中A) 紫檀芪 (PT)、B) 水飞蓟宾 (SIL) 和C) NAD⁺的水平 (在所有情况下, 每组6只小鼠)。

[0018] 图11. 在紫檀芪 (PT) 和水飞蓟宾 (SIL) 的辐射防护组合中添加潜在的辐射缓和剂 (烟酰胺核苷, NR; 和成纤维细胞刺激性脂肽-1, FSL-1)。A) 施用方案, B) 存活情况与辐照后时间 (以天为单位)。在所有情况下, 每组使用二十只小鼠。

[0019] 图12. 经 γ 辐照小鼠的死亡原因 (LD50/30) 以及辐射防护剂和辐射缓和剂组合施用 (PT、SIL、NR和FSL-1) 的效果。在所有情况下, 每组研究二十只小鼠。

[0020] 图13. 向A) 生长的人A549 (肺腺癌) 和B) MDA-MB-231 (三阴性乳腺癌) 异种移植物组合施用辐射防护/辐射缓和组合PT+SIL+NR+FSL-1 (PSNF) 和X射线。在所有情况下, 每组使用五只小鼠。

[0021] 图14. 辐射防护剂和辐射缓和剂对经 γ 辐照小鼠的细胞NAD⁺含量、DNA损伤和造血恢复的影响。A) PT、SIL、NR和烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) FK866的特异性非竞争性抑制剂对从经 γ 辐照的小鼠中分离的细胞的NAD⁺含量的影响 (每组、细胞类型和处理, $n=5$)。FK866在体内施用 (15mg/kg, 通过腹膜内注射每天两次, 持续6天且在辐照前3天开始, 参见图11a), 并且也存在于细胞培养物中 (100nM)。辐照后72小时分离细胞。使用学生t检验进行

统计学分析 ($P < 0.01$; *比较所有组与对照; +比较PT+SIL+NR+ γ 射线处理的小鼠或PT+SIL+NR+FK866+ γ 射线处理的小鼠与仅用 γ 射线处理的小鼠)。B) FK866对细胞NAMPT活性的影响 ($P < 0.01$; *比较FK866处理的小鼠与对照, $n = 5$)。如上(a)所述用抑制剂处理小鼠6天。C) PT、SIL、NR和FK866对从经 γ 辐照小鼠中分离的细胞中DNA损伤的影响(每组、细胞类型和处理, $n = 5$)。使用学生t检验进行统计学分析 ($P < 0.01$; *比较所有组与 γ 辐照对照; +比较存在FK866的 γ 辐照组与其各自的对照)。如上(a)所述处理小鼠并分离细胞。D) PT、SIL、NR和FSL1对经 γ 辐照的小鼠造血恢复的影响。对从对照和处理小鼠(每组和处理组, $n = 5$)分离的股骨中的造血集落形成细胞CFU-GM(集落形成单位-粒细胞、巨噬细胞)和CFU-GEMM(集落形成单位-粒细胞、红细胞、巨噬细胞、巨核细胞)进行定量。如图11a所示处理小鼠并在辐照后7天分离骨髓细胞。使用学生t检验进行统计学分析 ($P < 0.01$; *比较所有组与对照; +比较不同治疗+ γ 辐照与仅 γ 辐照)。

[0022] 图15. 紫檀芪和水飞蓟宾的处理对Nrf2、NF- κ B、PARP1和PGC1 α 依赖性机制的影响。从接受图11a所示方案的小鼠中分离出肠上皮细胞, 然后立即辐照。A) 蛋白质印迹检测细胞核提取物中的p65NF- κ B、Nrf2、PARP1和Sirt1、线粒体提取物中的Sirt3以及总提取物中的磷酸化PGC-1 α 。光密度分析(蛋白质印迹)代表每个分子和实验条件下5至6只不同小鼠的平均值 $\pm$ 标准偏差 ($P < 0.01$; *比较PT处理的、SIL处理的或PT+SIL处理的小鼠与生理盐水(PS)处理的小鼠, +比较PT+SIL处理的小鼠与PT处理的小鼠; #比较PT+SIL处理的小鼠与SIL处理的小鼠)。B) 不同信号传导机制之间潜在的分子相互作用和相互关系。Ub, 泛素; I κ B, B细胞抑制剂中 κ 轻多肽基因增强子的核因子; Keap1, Kelch样ECH相关蛋白1; RE, 反应元件; ARE, 抗氧化反应元件; MAF, 肌肉腱膜纤维肉瘤癌基因同系物; Ac, 乙酰化; IMF, 炎症介导因子。C) 特定信号传导相关分子的基因沉默。该图显示了 $n = 5$ 至6的不同实验和实验条件的代表性实验。PS, 生理盐水。D) 将分离的IEC在存在或不存在特定siRNA的情况下培养24小时, 然后用 γ 射线辐照(与体内实验使用的剂量相同)。如方法部分所述, 在 γ 辐照后12小时对分离并培养的IEC细胞中的细胞死亡进行分析。PT (20 μ M) 和SIL (15 μ M) 存在于含有从PT+SIL处理小鼠中分离出的IEC的培养物中。由此, 体内处理诱导的效果在体外条件下可以保留。数据为每个分子和实验条件下4至5次不同实验的平均值 $\pm$ 标准偏差 ($p < 0.01$; *比较在PS或PT+SIL下用特定siRNA处理与用溶媒处理的对照; $p < 0.01$; +比较PT+SIL下的数据与PS下的等同数据)。

发明内容

[0023] 一方面, 本发明涉及一种组合物, 其包含a) 紫檀芪或其盐, 和b) 水飞蓟宾或其盐。优选地, 该组合物还包含至少一种或多种辐射缓和剂化合物, 该辐射缓和剂化合物优选地选自a) NAD⁺加强剂和/或b) 成纤维细胞刺激性脂肽-1、或其任何盐。

[0024] 优选地, 该组合物还包含至少两种或更多种辐射缓和剂化合物, 其中该至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽-1、或其任何盐。

[0025] 优选地, 紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐, 和/或水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2', 3-二氢琥珀酸二钠盐。优选地, NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0026] 优选地, 该组合物是药物组合物、营养品组合物、化妆品组合物或食品组合物。

[0027] 另一方面, 本发明涉及用于预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的紫檀

芪或其药学上可接受的盐,其与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐组合,其中施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行;并且其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。

[0028] 优选地,紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以单一药物组合物或分开的药物组合物施用。优选地,紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐的施用是局部、口服或肠胃外施用。

[0029] 优选地,将紫檀芪或其药学上可接受的盐和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐在辐射之前和/或之后或两者,同时或依次施用数次。优选地,该组合的用量能够提供辐射防护作用。

[0030] 优选地,该用途还包括与至少一种或多种辐射缓和剂化合物组合施用,其中该组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐、和c) 至少一种或多种辐射缓和剂化合物或其任何药学上可接受的盐。

[0031] 优选地,至少一种或多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和/或成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。

[0032] 优选地,该用途还包括与至少两种或更多种辐射缓和剂化合物组合施用,其中该至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。优选地,NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0033] 优选地,电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关,更优选与急性辐射综合征和/或慢性辐射综合征有关。

[0034] 优选地,电离辐射是 γ 射线或X射线。

[0035] 优选地,紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

[0036] 另一方面,本发明涉及紫檀芪或其盐与水飞蓟宾或其盐组合的非治疗性美容用途,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐和b) 水飞蓟宾或其盐。优选地,用途是防护、改善和/或减少阳光对人皮肤和嘴唇的不利影响,例如老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皲裂、松弛、变薄、毛孔粗大。

[0037] 另一方面,本发明涉及用于增加有此需要的患者中去乙酰化酶(Sirtuin)的细胞内水平的紫檀芪或其盐,其与水飞蓟宾或其盐组合,其中所述增加是与在用紫檀芪或其盐与水飞蓟宾或其盐的组合治疗之前同一患者中去乙酰化酶的细胞内水平相比增加。优选地,有此需要的患者是患有神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症的患者。优选地,该病症选自阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病组成的列表。

[0038] 另一方面,本发明涉及用作营养品组合物的紫檀芪或其盐,其与水飞蓟宾或其盐组合,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐和b) 水飞蓟宾或其盐。优选地,用作营养品组合物的用途是用于治疗或预防电离辐射诱发的

疾病,用于治疗或预防神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症,和/或用于防护或修复阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响。优选地,电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。优选地,神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症选自阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病组成的列表。优选地,阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响选自以下组成的列表:老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皴裂、松弛、变薄、毛孔粗大、脂肪团形成、痤疮形成、红斑痤疮、银屑病和湿疹。

[0039] 另一方面,本发明涉及多部分试剂盒,该多部分试剂盒包括至少两个容器,该至少两个容器包含至少紫檀芪或其盐和水飞蓟宾或其盐、以及任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物。优选地,任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物选自a) NAD⁺加强剂和/或b) 成纤维细胞刺激性脂肽,或其任何药学上可接受的盐。优选地,NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。优选地,紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

具体实施方式

[0040] 一般定义

[0041] 必须注意的是,如本文所用,单数形式“一/一个”和“该”包括复数引用,除非上下文清楚地另有说明。此外,除非另有说明,一系列元素之前的术语“至少”应理解为指的是该系列中的每个元素。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的具体实施方式的许多等同物。这样的等同物旨在涵盖在本发明中。

[0042] 术语“约”当涉及给定的量或数量时意在包括正负百分之五的偏差。

[0043] 如本文所使用的,多个引用的元素之间的连接术语“和/或”被理解为涵盖单独的和组合的选项。例如,当两个元素通过“和/或”连接时,第一个选项是指在没有第二元素的情况下第一元素适用。第二个选项是指在没有第一元素的情况下第二元素适用。第三个选项是指第一元素和第二元素一起适用。这些选项中的任何一个都被理解为落入该含义内,并且因此满足本文所使用的术语“和/或”的要求。多于一个选项同时适用也被理解为落入该含义内,并且因此满足术语“和/或”的要求。

[0044] 在整个本说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,词语“包含(comprise)”以及诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”的变体将被理解为暗示包括所规定的整数或步骤、或整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤、或整数或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”可以被术语“含有”或“包括”替代,或者有时当在本文中使用时被术语“具有”替代。任何前述术语(包含、含有、包括、具有),无论何时在本发明的方面或实施方式的上下文中使用,都可以用术语“由……组成”替代,尽管是次优选的。

[0045] 当本文使用“由……组成”时,排除权利要求元素中未指定的任何元素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”不排除不会实质上影响权利要求的基本特征和新颖特征的材料或步骤。

[0046] 本文使用的术语“疾病”通常是同义的,并且与术语“病理”、“病症”和“病况”(如在

医学病况中) 互换使用, 因为所有这些都反映了身体或其某一部位的异常状况, 这种异常状况损害了正常功能, 并且通常表现为明显的体征和症状。

[0047] 本文中提到的“治疗有效量”定义为当施用至对象时足以实现对病症状态的这种治疗的化合物的量。“治疗有效量”可以根据化合物、所治疗的病症、对象的年龄和相对健康状况、施用途径和形式、本领域普通技术人员的判断以及其他因素而变化。

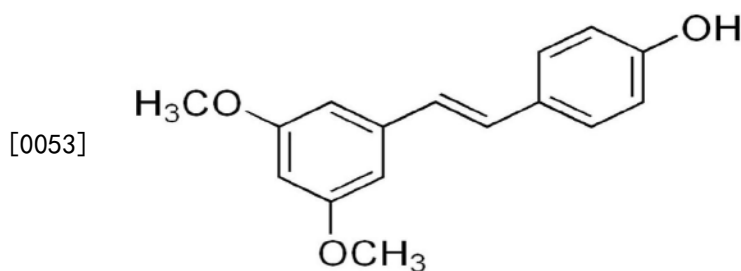
[0048] 本文使用的术语“治疗”是指针对疾病或损伤给予患者的医疗护理。该术语包括治愈疾病, 也包括改善、缓和或减少所述疾病的症状。因此, 本文使用的术语“治疗性治疗”或“治疗”是指使身体从病理状态或疾病恢复到其正常、健康状态。本文使用的术语“治疗性治疗”或“治疗”还指缓和、改善或减少辐射对对象的有害影响, 或以某种方式减少与此类影响相关的症状。本文使用的术语“预防性治疗”是指预防病理状态。

[0049] “预防”是指防止疾病发生。“改善”是指患者疾病的改善, 或者努力纠正所述疾病或至少使所述疾病更容易被接受的活动。“减少”或“缓和”是指降低疾病的严重程度、严重性或痛苦。

[0050] 本文使用的术语“对象”是指哺乳动物对象。优选地, 其选自人类、伴侣动物、非家养牲畜或动物园动物。例如, 对象可以选自人、狗、猫、牛、猪、羊、马、熊等。在优选的实施方式中, 所述哺乳动物对象是人对象。

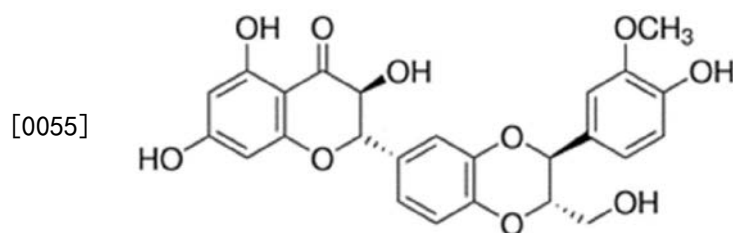
[0051] “电离辐射”是指由粒子、X射线或 γ 射线组成的辐射, 其具有足够的能量在其穿过的介质中引起电离。“ γ 射线”或“ γ 辐射”是指由原子核的放射性衰变产生的电磁辐射的穿透形式。它由波长最短的电磁波组成, 因此具有最高的光子能量。“X射线”或X辐射是指X辐射, 是一种高能电磁辐射的穿透形式。大多数X射线的波长范围为10皮米到10纳米, 对应的频率范围为30拍赫兹到30艾赫兹, 能量范围为124电子伏到124千电子伏。

[0052] “紫檀芪(pterostilbene)”或PT是指3,5-二甲氧基-4'-羟基芪或其盐、溶剂化物、异构体(对映体、非对映体)、水合物或任何已知的衍生物、合成变体和可接受的制剂(例如药物、化妆品、营养品)。紫檀芪(PT)是一种天然抗氧化剂, 也是白藜芦醇的天然类似物, 但其抗真菌效果几乎是白藜芦醇的60至100倍, 并且具有类似的抗癌特性。它主要存在于蓝莓和红葡萄中, 但定量研究表明, 相对于每10份反式白藜芦醇, 仅有1至2份反式紫檀芪。紫檀芪对应于下式:



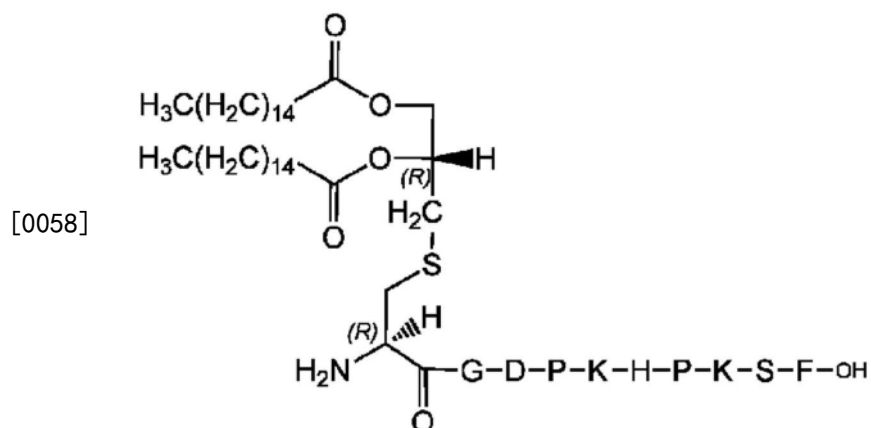
[0054] “水飞蓟宾(silibinin)”或SIL也称为水飞蓟宾(silybin)或水飞蓟素(silymarin)(均来自水飞蓟(乳蓟)), 是从菊科的具有两个蓟物种的属中获得的黄酮类化合物。水飞蓟宾包括其任何盐、溶剂化物、异构体(对映体、非对映体)、水合物或任何已知的衍生物、合成变体和可接受的制剂(例如药物、化妆品、营养品)。这些植物原产于欧洲的地中海地区、北非和中东。水飞蓟宾(SIL)是水飞蓟素的主要活性成分, 水飞蓟素是乳蓟种子的标准化提取物, 含有由水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭、水飞蓟宁等组成的黄酮木脂素

混合物。水飞蓟宾本身是两种非对映异构体水飞蓟宾A和水飞蓟宾B以大约等摩尔比的混合物。SIL也称为3,5,7-三羟基-2-[3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-2-(羟甲基)-2,3-二氢-1,4-苯并二氧六环-6-基]-2,3-二氢色烯-4-酮,具有下式:

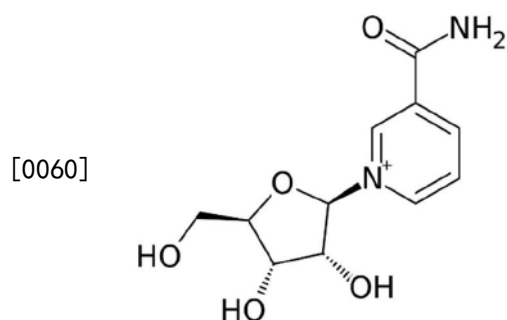


[0056] 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸加强剂、NAD⁺前体或NAD⁺加强剂是指如Rajman et al., Cell Metab. 2018 March 06; 27(3): 529-547. doi:10.1016/j.cmet.2018.02.011的文献明确公开的任一化合物,例如NAD前体、NAD合成的激活剂或NAD⁺降解的抑制剂。烟酰胺包括其任何盐、溶剂化物、异构体(对映体、非对映体)、水合物或任何已知的衍生物、合成变体和可接受的制剂(例如药物、化妆品、营养品)。

[0057] “成纤维细胞刺激性脂肽”或FSL-1是指To11样受体2/6激动剂或其盐、溶剂化物、异构体(对映体、非对映体)、水合物或任何已知的衍生物、合成变体和可接受的制剂(例如药物、化妆品、营养品),并且对应于下式:



[0059] 烟酰胺核苷是指类似于维生素B3的吡啶核苷,充当烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或NAD⁺的前体。NR具有下式:



[0061] 本文所用的术语“多部分试剂盒”是指组合制剂,其中活性成分在物理上分离以用于通过向患者同时施用或依次施用进行的组合治疗。

[0062] 具体实施方式

[0063] 已知将多种天然化合物在辐射前施用至对象时具有辐射防护作用。如图2A所示,

诸如紫檀芪 (PT)、没食子酸、EGCG 等的化合物使瑞士白化小鼠在辐射后 6 天的存活率约为 100%。然而,一些化合物无法更长时间地保护小鼠。例如,30 天后 (图 2B),木犀草素的存活百分比降低了约 40%,而 60 天后 (图 2C),其存活百分比为 0%。因此,需要能够在长时间内发挥高水平保护的化合物。

[0064] 尽管这些化合物可以组合并一起施用,但无法预测这种组合所产生的辐射防护作用。在一些情况下,当一种化合物与另一种化合物组合时,该化合物的辐射防护特性不会改变。例如,如图 2C 所示,施用 PT 的小鼠在进行辐射后 60 天的存活率为 40%。飞燕草素提供约 12% 的存活率。然而,当 PT 与飞燕草素组合使用时,所得的存活率仍保持在 40% 左右,这大约是 PT 化合物单独提供的存活率。在这种情况下,飞燕草素的效果不会叠加到 PT 的效果中。

[0065] 在其他情况下,令人惊讶的是,一种化合物的辐射防护作用受到另一种化合物的共同施用的负面影响。如图 2C 所示,其中 PT 的辐射防护作用可在 60 天后提供 40% 的存活率,而没食子酸可提供约 5% 的防护。然而,当两种化合物组合使用时,总体存活率约为 35%,导致辐射防护作用比单独使用 PT 降低。

[0066] 在其他情况下,两种化合物的辐射防护作用在它们组合时会相加,从而产生将它们各自的作用相加而得到的防护。例如,图 2C 显示 PT 提供的防护约为 40%,染料木素提供的防护约为 7%。因此,当两种化合物组合时,产生的防护效果约为 45%,这意味着两种化合物都在发挥其作用,并且总体防护差不多是两种化合物效果的总和。

[0067] 更有趣的是,本发明的作者惊奇地发现,两种化合物的组合不仅可以导致无变化,或有损失的防护或累加的防护,而且在极少数情况下,两种化合物的组合还导致辐射防护性能增强,而不是其效果的单纯累加。也就是说,特定化合物的特定组合提供了增强的防护,这种防护不能通过其单独效应的累加来解释,这意味着它们之间存在协同效应。这如图 2B 和 2C 所示。在图 2C 中,水飞蓟宾 (SIL) 提供约 10% 的存活率,PT 提供约 40% 的存活率,但两者的组合提供大于 70% 的存活率。这清楚地表明,SIL 和 PT 的组合不仅产生其辐射防护性能的附加效果,而且还产生协同效应,从而增强辐射防护。

[0068] 这些发现表明,为了获得增强的辐射防护,应注意组合的化合物,因为某些组合能够增强辐射防护,而其他组合则是有损失的,在后一种情况下,单独地施用复合物会是更可取的。

[0069] 因此,为了获得增强的辐射防护,不能任意地组合具有不同辐射防护特性的化合物,因为这种组合并不总是导致整体增强的辐射防护。根据共同施用的化合物,所产生的辐射防护可能更差,可以是相同的或者是两种化合物的总和,但同时,一些组合在一起的化合物提供了协同效应和增强的防护,而这不能从其辐射防护特性的单纯总和得出。

[0070] 发明人发现的另一个方面是 PT 和 SIL 的特定组合提供了长时间的防护。这是令人惊讶的,因为如上所述,并非所有化合物都发挥辐射防护作用超过 30 天,例如,参见图 2B (30 天) 中的 EGCG、槲皮素、柚皮苷或根皮苷化合物,其中它们的辐射防护作用在 60 天后降低至 0% (图 2C)。然而,如图 3 所示,PT 和 SIL 的组合在第 360 天 (即一年后) 提供了约 25% 的存活率 (20 只小鼠中有 5 只存活)。因此,PT 和 SIL 的组合不仅可以产生协同增强的防护作用,而且这种作用也是持久的。此外,如图 11B 所示,当 PT 和 SIL 与其他辐射缓和剂化合物 (例如烟酰胺核苷 (NR) 或成纤维细胞刺激性脂肽-1 (FSL-1)) 组合时,一年后的存活率甚至进一步增加到最高达 50 至 60%,值得注意的是,当四种化合物 (PT、SIL、NR 和 FSL-1) 组合时,它们在 360 天

后为动物提供几乎完全的防护(90%)。

[0071] 总之,本发明提供了两个主要发现:一方面,发现PT和SIL这两种具有辐射防护特性的天然化合物的共同施用提供了增强且持久的协同辐射防护,这种协同辐射防护并非是从其相应的辐射防护作用的单纯累加得出。另一方面,还发现这两种化合物与辐射缓和剂化合物例如NR和/或FSL-1的组合可以进一步增强对辐射的防护,即便是一年的长期存活率也高达90%。

[0072] 为了详细研究SIL和PT的协同作用,发明人进一步研究了PT+SIL组合引起的防护作用中可能涉及的潜在信号传导通路。如图15a所示,与对照相比,PT和SIL均增加核Nrf2,同时降低核NF- κ B水平。这些作用总体上表明在促进抗氧化防御同时下调NF- κ B依赖性促炎症反应方面具有协同作用。pPGC-1 α 也因PT而增加(图15a)。有趣的是,尽管单独的SIL不影响Sirt1水平,但是两种多酚的组合比单独的PT更能增加Sirt1水平(图15a)。这些结果得出这样的结论:PT和SIL的协同作用是基于这两种化合物在减轻细胞中发生的氧化应激和DNA损伤方面的协作作用,并为利用包含这两种化合物的组合物用于化妆品、营养学、营养品和医学领域开辟了道路。

[0073] 紫檀芪用于预防、改善或减少电离辐射诱发的疾病

[0074] 本发明的第一方面涉及用于治疗、预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)或其药学上可接受的盐或衍生物,其与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐或衍生物组合。优选地,使用的芪类化合物是紫檀芪或其药学上可接受的盐。因此,在第一方面,本发明提供用于治疗、预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的紫檀芪或其药学上可接受的盐,其与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐组合,其中施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行;并且其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。在具体的实施方式中,电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。在优选的实施方式中,电离辐射诱发的疾病是急性辐射综合征和/或慢性辐射综合征。在另一个实施方式中,所述疾病选自皮肤病、急性辐射综合征、癌症和心血管疾病组成的组。

[0075] 根据本发明的第一方面,紫檀芪与水飞蓟宾组合使用。PT和SIL可以以单独的组合物或分开的组合物施用。

[0076] 在优选的实施方式中,紫檀芪是紫檀芪磷酸二钠盐。在另一个优选的实施方式中,水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

[0077] 如上所述,PT和SIL或其任何药学上可接受的盐或衍生物组合施用以预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病。在优选的实施方式中,对象是哺乳动物。更优选地,对象是人类。

[0078] 施用时间表和途径

[0079] 施用可以是同时的(在同一时间)或依次的。如本文所用,“依次施用”是指在施用PT或包含其的组合物之前不久或之后不久施用SIL或包含其的组合物。如本文所用的“之前不久或之后不久”应理解为在1至24小时的间隔内,优选1至12小时,优选1至3小时,优选2小时内,更优选1小时或更短时间内,例如45分钟、30分钟、15分钟或更短时间内。在一个实施方式中,首先施用PT,随后施用SIL。在另一个实施方式中,首先施用SIL,然后施用PT。在一

个优选的实施方式中,PT和SIL施用同时进行。在一个实施方式中,PT和SIL作为单一组合物的一部分或作为两种不同组合物的一部分同时组合施用。

[0080] 在一个实施方式中,所述药学上可接受的化合物和组合物被配制为与其预期的施用途径相容。完成施用的方法是本领域普通技术人员已知的。这包括例如通过肠胃外途径注射,例如血管内、静脉内、动脉内、皮下、肌内、腹膜内、心室内、硬膜外(intraepidural)或其他途径以及口服、局部、鼻、眼、直肠或局部。还特别考虑通过诸如积存注射或易蚀植入物的方式进行持续释放施用。优选的施用途径是肠胃外施用,其在此处理解为在一个或多个血管内施用并且通常包括静脉内或动脉内施用。目前,最优选的施用途径是肠胃外、口服或局部施用。

[0081] 施用可以仅进行一次,或者可以进行多于一次的施用。在优选的实施方式中,将化合物施用数次。在具体的实施方式中,施用可以包括至少一剂、二剂、三剂、四剂、五剂、六剂、七剂或更多个剂量。

[0082] 可以在辐射发生之前、期间或之后进行施用。例如,可以在辐射发生前至少10、9、8、7、6、5、4、3、2、1天进行施用。在另一个实施方式中,在辐射之后进行施用。在一个实施方式中,在辐射发生后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10天,例如20或30天,或多于一个月进行施用,例如辐射后2、3、5、6、8、9个月。在一个具体实施方式中,施用在辐射发生的同一天、之前或之后进行。在一个实施方式中,施用由在辐射发生之前、当天和/或之后的几天期间施用的数个剂量组成。在优选的实施方式中,将紫檀芪和水飞蓟宾或其任何药学上可接受的盐在辐射之前和/或之后或两者,同时或依次施用数次。

[0083] 用量

[0084] 将根据施用途径、治疗方案和/或施用时间表,并考虑到现有的毒性和有效性数据来选择最佳剂量。在优选的实施方式中,根据本发明第一方面的用途的PT和SIL以能够提供辐射防护作用的用量施用。如上所述,“辐射防护”被理解为减少辐射造成的直接损伤的能力。因此,在本发明中,PT和SIL的用量没有特别限制。

[0085] 此外,对于本领域技术人员来说显而易见的是,将本文公开的应用于小鼠模型的剂量换算为应用于人类的等效剂量。为此,技术人员可以参考众所周知的动物和人之间剂量换算的通用实践指南,参见例如Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharma 2016; 7:27-31。简而言之,可以将小鼠模型的治疗剂量除以约12.3来换算成人类的治疗剂量。也就是说,如果100mg/kg的剂量对小鼠有治疗作用,则人的等效剂量为8.13mg/kg。

[0086] 在一个实施方式中,PT或其药学上可接受的盐以最多500mg/kg的用量施用。PT可以以300mg/kg至30mg/kg的用量施用。优选地,PT以200mg/kg至40mg/kg或150mg/kg至40mg/kg的用量施用。更优选地,PT以100mg/kg的用量施用。在一个实施方式中,PT或其药学上可接受的盐以最多40.65mg/kg的用量施用。PT可以以24.39mg/kg至2.43mg/kg的用量施用至人。优选地,PT以16.2mg/kg至3.25mg/kg或12.19mg/kg至3.25mg/kg的用量施用至人。更优选地,PT以8.13mg/kg的用量施用至人。

[0087] 在另一个实施方式中,SL或其药学上可接受的盐以最多500mg/kg的用量施用。SL可以以200mg/kg至35mg/kg的用量施用。优选地,SL以150mg/kg至40mg/kg或100mg/kg至50mg/kg的用量施用。更优选地,PT以70mg/kg的用量或人的等效用量施用。在另一个实施方

式中,SL或其药学上可接受的盐以最多40.65mg/kg的用量施用至人。SL可以以16.26mg/kg至2.84mg/kg的用量施用至人。优选地,SL以12.19mg/kg至3.25mg/kg或8.13mg/kg至4.06mg/kg的用量施用至人。更优选地,PT以5.69mg/kg的用量或人的等效用量施用至人。

[0088] 其他化合物的施用

[0089] 在第一方面的实施方式中,任何上述实施方式中描述的用途还包括与至少另一种辐射缓和剂化合物组合施用,其中本文描述的用途在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐、和c) 一种或多种辐射缓和剂化合物。在优选的实施方式中,至少一种或多种辐射缓和剂化合物是指烟酰胺腺嘌呤二核苷酸加强剂(以下称为NAD⁺加强剂)和/或成纤维细胞刺激性脂肽-1(以下称为FSL-1)、或其任何药学上可接受的盐。请注意,在本发明的上下文中,尽管FSL-1是优选的,但是FSL-1是成纤维细胞刺激性脂肽的一种类型并且因此可以被任何其他成纤维细胞刺激性脂肽替代。因此,本发明任何实施辐射中使用的术语“FSL-1”可以被任何其他合适的成纤维细胞刺激物替代。

[0090] 如上文所定义的,“辐射缓和剂”是即使在已释放辐射后也能够将毒性降至最低的化合物。因此,在第一方面的实施方式中,PT与SIL组合施用还包括施用一种或多种辐射缓和剂化合物。PT、SIL和一种或多种辐射缓和剂化合物之间的组合不受限制,即,PT可以与SIL和一种或多种辐射缓和剂在单一组合物中一起施用,或者它们可以在不同的组合物中单独施用。三种(或四种或更多种)化合物的所有可能的组合均包括在本文中。

[0091] 上述施用途径和时间表也适用于PT和SIL与一种或多种辐射缓和剂化合物一起施用的情况。

[0092] 在优选的实施方式中,PT与SIL、其盐或其衍生物组合在预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病中的用途还包括施用NAD⁺加强剂。因此,在该实施方式中,将至少三种化合物一起施用,并且该至少三种化合物可以包含在相同或不同的组合物中并且可以依次或同时施用。

[0093] 在另一个优选的实施方式中,PT与SIL、其盐或其衍生物组合在预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病中的用途还包括施用FSL-1。因此,在该实施方式中,至少三种化合物一起施用,并且该至少三种化合物可以包含在相同或不同的组合物中并且可以依次或同时施用。

[0094] 在优选的实施方式中,PT与SIL、其盐或其衍生物组合在预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病中的用途还包括施用NAD⁺加强剂和FSL-1。因此,在该实施方式中,四种化合物可以包含在相同或不同的组合物中并且可以依次或同时施用。

[0095] 在更优选的实施方式中,NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷或1-(β-D-呋喃核糖基)烟酰胺(以下称为NR)、其药学上可接受的盐或衍生物。

[0096] 在还更优选的实施方式中,PT与SIL、其盐或其衍生物组合在预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病中的用途还包括施用NR和FSL-1。因此,在该实施方式中,四种化合物在一个剂量或多于一个剂量中一起施用,该四种化合物包含在相同或不同的组合物中并且在辐射之前、期间或之后依次或同时施用。

[0097] 在优选的实施方式中,在辐射前几天和/或辐射后几天期间每天施用一次PT和SIL。更优选地,在辐射前10、9、8、7、6、5、4、3、2、1天(优选5天)期间每天施用PT和SIL。在另

一个实施方式中,在辐射之前和辐射之后最多5、4、3、2、1天每天施用PT和SIL。优选地,在辐射前的前5天和辐射后的2天内每天施用PT和SIL。

[0098] 在另一个实施方式中,在辐射的同一天和辐射后的下个月期间每天施用一次NAD+加强剂。在另一个实施方式中,在辐射后至少60分钟施用NAD+加强剂并且在辐射后接下来的30天内进一步施用NAD+加强剂。

[0099] 在另一个实施方式中,FSL-1仅施用一次,优选在辐射后,更优选在辐射后至少一天。

[0100] 在一个实施方式中,NAD+加强剂或其药学上可接受的盐以最多500mg/kg的用量施用。在一个实施方式中,NAD+加强剂或其药学上可接受的盐以400mg/kg至100mg/kg的用量施用。优选地,NAD+加强剂以300mg/kg至150mg/kg或200mg/kg至150mg/kg的用量施用。更优选地,NAD+加强剂以185mg/kg的用量施用。在一个实施方式中,NAD+加强剂或其药学上可接受的盐以最多40.65mg/kg的用量施用至人。在一个实施方式中,NAD+加强剂或其药学上可接受的盐以32.52mg/kg至8.13mg/kg的用量施用至人。优选地,NAD+加强剂以24.39mg/kg至12.19mg/kg或16.26mg/kg至12.19mg/kg的用量施用至人。更优选地,NAD+加强剂以15.04mg/kg的用量施用至人。

[0101] 在另一个实施方式中,NAD+加强剂是烟酰胺核苷或其任何药学上可接受的盐,并且其以400mg/kg至100mg/kg的用量施用。优选地,烟酰胺核苷以300mg/kg至150mg/kg或200mg/kg至150mg/kg的用量施用。更优选地,烟酰胺核苷以185mg/kg的用量施用。在另一个实施方式中,NAD+加强剂是烟酰胺核苷或其任何药学上可接受的盐,并且其以32.52mg/kg至8.13mg/kg的用量施用至人。优选地,烟酰胺核苷以24.39mg/kg至12.19mg/kg或16.26mg/kg至12.19mg/kg的用量施用至人。更优选地,烟酰胺核苷以15.04mg/kg的用量施用至人。

[0102] 在一个实施方式中,FSL-1或其药学上可接受的盐以最多1mg/kg的用量施用。在另一个实施方式中,FSL-1化合物或其药学上可接受的盐以1mg/kg至0.1mg/kg的用量施用。优选地,FSL-1化合物以0.75mg/kg至0.1mg/kg或0.5mg/kg至0.1mg/kg的用量施用。更优选地,FSL-1化合物以0.25mg/kg的用量施用。在一个实施方式中,FSL-1或其药学上可接受的盐以最多0.08mg/kg的用量施用。在另一个实施方式中,FSL-1化合物或其药学上可接受的盐以0.08mg/kg至0.008mg/kg的用量施用。优选地,FSL-1化合物以0.06mg/kg至0.008mg/kg或0.04mg/kg至0.081mg/kg的用量施用。更优选地,FSL-1化合物以0.020mg/kg的用量施用。

[0103] 在一个实施方式中,电离辐射是伽马(γ)射线或X射线。

[0104] 包含PT和SIL的组合物

[0105] 在第二方面,本发明涉及组合物,其包含a) 芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)或其盐或衍生物、和b) 水飞蓟宾或其盐或衍生物。优选地,芪类化合物是紫檀芪或其盐。因此,本发明的第二方面提供了一种组合物,其包含a) 紫檀芪或其盐和b) 水飞蓟宾或其盐。优选地,该组合物是药物组合物、营养品组合物、化妆品组合物或食品组合物。为了本发明的目的,术语营养品是指“食品-药品(food-drug)”,即,将营养组分与有效性已得到证明和公认的天然活性成分(在本情况下为PT和SIL)的治疗特性相关联的健康食品。

[0106] 药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体,例如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油和乙醇。其中还可以包括药学上可接受的盐,例如:无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸的盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。还优选的

是,制剂将含有药学上可接受的赋形剂,其用作稳定剂,特别是,如果在疫苗组合物中要包含肽、蛋白质或其他类似分子的话,则该稳定剂是针对这些肽、蛋白质或其他类似分子的稳定剂。合适的载体的实例包括但不限于药品级的右旋糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、肌醇、葡聚糖等。其他合适的载体包括淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量聚乙二醇(PEG)及其组合。雷明顿制药科学(2012年,第22版)中可以获得对药学上可接受的赋形剂、添加剂和载体的全面讨论。

[0107] 关于药物制剂、结构修饰和递送系统的不同选择可以帮助促进PTE和SIL的口服施用,并且也包括在本文中。一些实例包括前药(羧酸酯、磺酸酯、硫酸酯、磷酸酯、缩醛或氨基甲酸酯或碳酸酯)、纳米乳液、封装纳米颗粒的聚离子/聚合物壳、脂质体或外泌体。特别地,PTE和SIL的任何药学上可接受的制剂均包括在本文中。

[0108] 根据第二方面的一种或多种组合物包含本发明第一方面中定义的用量的PT和SIL,并且其根据本发明第一方面中定义的施用途径和时间表来施用。根据本发明的第一方面,还提供了关于所述组合物的施用用量、途径和时间表的进一步细节和优选实施方式。

[0109] 所述组合物包含PT和SIL或其任何盐或衍生物,并且还可包含一种或多种辐射缓和剂化合物,如根据本发明第一方面所定义的。如上所述,在一个实施方式中,辐射缓和剂化合物可以是NAD⁺加强剂和/或FSL-1。在优选的实施方式中,包含PT和SIL的组合物还包含至少两种辐射缓和剂化合物,优选NR和FSL-1。

[0110] 优选地,所述一种或多种组合物是适合于肠胃外、口服或局部施用的形式。在优选的实施方式中,所述组合物是水性组合物,更优选稳定的水性组合物。如本文所用,“稳定的组合物”可以指其中的活性成分在储存后基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。

[0111] 第二方面的一种或多种组合物可以是食品组合物。食品组合物可以是液体组合物或固体组合物。在本发明的上下文中,这种液体组合物包括但不限于选自以下组成的组中的任何饮料:动物奶或植物奶及其任何衍生物,例如奶昔、酸奶、克菲尔等;水果汁和/或蔬菜汁;不带气的水或苏打水,或调味或加糖的水或饮料(借助营养甜味剂(蔗糖、果糖……)或人工甜味剂);调味料、任何类型的酒精饮料;茶、咖啡;以及所有类型的清凉饮料或软饮料,或能量饮料。

[0112] 食品组合物也可以是固体组合物。这种固体组合物例如可以选自但不限于由以下组成的组:动物奶或植物奶衍生物,例如奶酪、黄油、人造黄油和豆腐;任何类型的面包,包括新鲜、包装或冷冻的面包、切片面包、全麦面包、香料面包、甜面包、咸面包等;由任何谷物粉例如小麦或粗粒小麦粉制成的意大利面(通心粉、意大利面条、面条等);焙烤食品;用于制备饮料的散装或小袋的浸剂、茶或咖啡;果冻、糖果,包括软糖,俗称“软水果糖”;以及任何类型的固体调味料或其混合物。

[0113] 最后,食品组合物还可以是营养、膳食或食品补充剂或补充物。这些术语通常用于口服组合物,其包含旨在补充饮食的成分,在本发明的情况下即PT和SIL或其任何盐或衍生物。它们绝不能取代传统食品或成为膳食或饮食的唯一组成部分。该组合物还可以是营养品组合物。该组合物还可用于制备功能性食品或在添加PTE与SIL组合后具有额外功能的食品,如在整个说明书中所定义的。营养、膳食或保健品组合物或食品补充剂或功能性食品可以以不同的形式存在,例如锭剂、丸剂、片剂、胶囊、软明胶胶囊、明胶胶囊、糯米纸囊剂

(wafer)、泡腾片、液体(溶液、悬浮液、糖浆)、颗粒和粉末,所有这些都作为具体实施方式包括在本发明的范围内。饮食上或药学上可接受的赋形剂对于本领域技术人员获得前述的任何内容来说是显而易见的,并且它们包括在本发明的范围内。

[0114] 本发明还涉及用于如本发明第一方面所定义的用途的所述组合物。

[0115] 包含PT和SIL的多部分试剂盒

[0116] 在第三方面,本发明涉及多部分试剂盒,该多部分试剂盒包括至少两个容器,该至少两个容器包含至少a) 芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)和水飞蓟宾或其任何盐或衍生物,以及任选的至少一种或多种如上所定义的辐射缓和剂化合物。优选地,包含在多部分试剂盒中的芪类化合物是紫檀芪。

[0117] 通常,提供两种或更多种成分以配制为组合物,并且该两种或更多种成分提供在两个或更多个单独的容器中。例如,PT和SIL可以在一个容器中组合,而辐射缓和剂在另一个容器中。在一个实施方式中,将每种化合物包含在单独的容器中。在进一步的实施方式中,辐射缓和剂化合物存在于与辐射缓和剂化合物类似的容器中。

[0118] 优选地,所述组合物如本发明前述方面中所定义,用于如本发明前述方面中所定义的用途,优选用于对电离辐射诱发的疾病进行治疗性治疗。

[0119] 预防、改善或减少电离辐射诱发的疾病的方法

[0120] 在第四方面,本发明涉及预防、治疗(包括改善或减少)对象中电离辐射诱发的疾病的方法,其包括向对象施用芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)或其药学上可接受的盐或衍生物与水飞蓟宾或其任何药学上可接受的盐或衍生物的组合。优选地,芪类化合物是紫檀芪。因此,在第四方面,本发明提供了预防、治疗(包括改善或减少)对象中电离辐射诱发的疾病的方法,其包括施用紫檀芪和水飞蓟宾、或其任何药学上可接受的盐的组合,其中所述施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行;并且其中该组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其任何药学上可接受的盐、和任选的c) 至少一种或多种辐射缓和剂化合物,如在整个本说明书中所定义的。与上文在本发明的第一和第二方面中描述的类似,至少一种或多种辐射缓和剂化合物可以是NAD⁺加强剂和/或FSL-1。

[0121] 该第四方面与上述第一方面和第二方面相关。因此,化合物和药物组合物、施用用量、途径和时间表根据本发明的前述方面提供并且在此处适用。

[0122] 紫檀芪与水飞蓟宾组合用于营养品领域或用作营养品组合物

[0123] 在第五方面,本发明还涉及芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)与水飞蓟宾、或其任何盐或衍生物组合的用途,或根据第二方面的组合物的用途,其中所述用途是在营养品领域或作为营养品组合物的用途。优选地,使用的芪类化合物是紫檀芪。因此,第五方面提供用于营养品领域或用作营养品组合物的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。

[0124] 在优选的实施方式中,用作营养品组合物的用途是用于治疗或预防电离辐射诱发的疾病,用于治疗或预防神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症,和/或用于防护或修复阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响。术语“修复阳光对人皮肤或嘴唇的不利影响”在本文中用于指阻止、逆转、改善、减小和/或减少皮肤的缺陷、瑕疵或美观上令人不愉快的状况,

包括但不限于:老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皴裂、松弛、变薄、毛孔粗大、脂肪团形成、痤疮形成、红斑痤疮、银屑病和湿疹。术语“皮肤”包括面部或身体皮肤。

[0125] 优选地,电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。更优选地,电离辐射诱发的疾病是选自自由急性辐射综合征和/或慢性辐射综合征组成的列表。

[0126] 优选地,营养品组合物用于治疗选自以下组成的列表中的病症:阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病。

[0127] 该第五方面与上述第一方面和第二方面相关。因此,化合物和药物组合物、施用用量、途径和时间表根据本发明的前述方面提供并且在此处适用。

[0128] 紫檀芪与水飞蓟宾组合作为化妆品组合物用于非治疗性用途

[0129] 在第六方面,本发明还涉及芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)与水飞蓟宾、或其任何盐或衍生物组合的非治疗性美容用途。此外,第六方面还涉及根据第二方面的组合物的非治疗性美容用途。优选地,使用的芪类化合物是紫檀芪。因此,本发明的第六方面提供用于非治疗性美容用途或作为化妆品组合物的与水飞蓟宾或其盐的组合的紫檀芪或其盐,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。

[0130] 如本文所用,表述“非治疗性美容用途”是指用于改善人的外观,即美化外观的方法。用于化妆品中不涉及通过手术或治疗进行的处理。美容护理包括在待处理的皮肤区域局部施用PTE和SIL。优选地,组合物的美容用途是具有清洁、美化、增加吸引力、改变外观或保持或促进皮肤或毛发处于良好状态的非治疗性目的。所述目的还可以是美白、尽可能减少面部和身体上的纹路、防护阳光和太阳光线。在一个实施方式中,非治疗性化妆品用途是预防、减少和/或改善皮肤老化的自然过程。

[0131] 优选地,非治疗性用途是防护、改善和/或减少阳光对人皮肤和嘴唇的不利影响,包括但不限于老年斑、晒伤、晒斑、纹路、细纹、皱纹、鱼尾纹、蜘蛛纹、妊娠纹、黑眼圈、色素沉着、色素减退、变色、肤色不均、暗沉、雀斑、皮肤爆痘、瑕疵、皮肤脆弱、干燥、斑块、触觉粗糙、皴裂、松弛、变薄、毛孔粗大。术语“皮肤”包括面部或身体皮肤。

[0132] 该第六方面与上述第一方面和第二方面相关。因此,化合物和组合物、施用用量、途径和时间表与美容用途相容,并且根据本发明的前述方面提供,也在此处适用。

[0133] 紫檀芪与水飞蓟宾组合用于增加细胞内去乙酰化酶的水平

[0134] 基于图5至图8中报告的数据,PT+SIL被证明可以针对诱导的氧化损伤发挥保护作用。此外,如图15所示,发现该机制与PTE+SIL引起的去乙酰化酶(Sirt)水平、特别是Sirt1的协同增加直接相关。去乙酰化酶是参与代谢调节的信号蛋白家族,因为它们控制许多重要功能,还参与多种病理学,例如代谢、心血管、肺部疾病、神经退行性和年龄相关病症以及癌症。去乙酰化酶已被证明是炎症和自噬的调节剂。越来越多的证据表明,去乙酰化酶激活或增加化合物显示出作为治疗代谢功能障碍、癌症和年龄相关疾病的治疗方法的前景,强有力地支持PTE与SIL组合用于治疗或预防所述疾病的用途。特别是,一些研究表明去乙酰

化酶在神经保护中的作用,特别是在神经退行性病症中的作用,如阿尔茨海默病或其他痴呆症或与衰老相关的认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肌萎缩侧索硬化症和其他神经元相关疾病(参见Kim D等人.SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis.EMBO J.2007;26(13):3169-3179;Donmez G等人.SIRT1 protects against α -synuclein aggregation by activating molecular chaperones.J Neurosci.2012;32(1):124-132;Outeiro TF等人.Sirtuin 2 inhibitors rescue α -synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease.Science.2007;317(5837):516-519;Pallos J等人.Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease.Hum Mol Genet.2008;17(23):3767-3777;Luthi-Carter R等人.SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis.Proc Natl Acad Sci U S A.2010;107(17):7927-7932;Shindler KS等人.SIRT1 activation confers neuroprotection in experimental optic neuritis.Invest Ophthalmol Vis Sci.2007;48(8):3602-3609;Montie HL等人.SIRT1 modulates aggregation and toxicity through deacetylation of the androgen receptor in cell models of SBMA.J Neurosci.2011;31(48):17425-17436)。

[0135] 鉴于此,在第七方面,本发明提供了用于增加有此需要的患者中去乙酰化酶的细胞内水平的芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)与水飞蓟宾、或其任何盐或衍生物的组合、或根据第二方面的组合物,其中所述增加是与在用芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)与水飞蓟宾、或其任何盐的组合治疗之前、或在用根据第二方面的组合物治疗之前同一患者中去乙酰化酶的细胞内水平相比增加。优选地,芪类化合物是紫檀芪。优选地,细胞内水平增加的去乙酰化酶是Sirt1、Sirt2、或Sirt3,最优选Sirt1。与未治疗的患者相比,细胞内去乙酰化酶水平的增加优选是统计学上显著的增加,并且其可以通过旨在测量蛋白质的量的任何合适的技术来测量,例如但不限于Bradford测定、比色法蛋白质测量BCA、基于抗体的测定,例如蛋白质印迹或ELISA、Lowry蛋白质测定、基于荧光的测定、基于蛋白质质谱的测定、基于纳米粒子和纳米孔的方法等。

[0136] “去乙酰化酶的细胞内水平统计学上显著的增加”在本文中是指分析人员确定所述蛋白质(在这种情况下是去乙酰化酶)的表达或活化水平的增加不能仅凭偶然来解释。统计假设检验是本领域技术人员做出这种确定的方法。该检验提供了p值,其是假设结果确实仅由偶然引起而观察到与数据中的结果一样极端的结果的概率。p值为0.1或更低(优选0.05、0.01、0.001或更低)在本文中被认为是统计学上显著的。例如,当进行统计检验以将去乙酰化酶的细胞内水平与参考或未处理细胞中去乙酰化酶的基础细胞内水平进行比较,并且其中所述统计检验所得的p值为0.1或更低,优选0.05、0.01、0.001或更低时,则去乙酰化酶的细胞内水平的增加是统计学上显著的。

[0137] 优选地,有此需要的患者患有以去乙酰化酶的细胞内水平降低、优选Sirt1细胞内水平降低为特征的疾病或病症。优选地,有此需要的患者患有神经退行性、心血管、肺、代谢或衰老相关病症,这些病症的特征是与健康人中去乙酰化酶的细胞内水平相比,去乙酰化酶、优选Sirt1的细胞内水平降低。优选地,该病症选自阿尔茨海默病或与衰老相关的其

他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病组成的列表。

[0138] 优选地,紫檀芪或其盐与水飞蓟宾或其盐组合用于治疗、预防、改善或减少神经退行性疾病,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。优选地,所述病症的特征是与健康人相比,细胞内去乙酰化酶、优选Sirt1水平降低。在一个实施方式中,神经退行性疾病选自阿尔茨海默病或与衰老相关的其他痴呆或认知障碍、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、肯尼迪病(脊髓和延髓肌萎缩)、肾病、脑血管疾病、高血压、慢性阻塞性肺病、肌萎缩侧索硬化症和糖尿病组成的组。在一个实施方式中,在治疗后去乙酰化酶(优选Sirt1)的细胞内水平增加的细胞来自神经组织。优选地,细胞是神经元或神经胶质细胞。

[0139] 此外,众所周知,去乙酰化酶是治疗糖尿病等代谢性疾病的潜在治疗靶点。多项研究表明,胰腺细胞中Sirt1的过表达可用于控制糖尿病患者的糖血症(参见Nerurkar等人. Respected Sir(2): magic target for diabetes. *Cellscience*. 2008; 4(4): 82-96; Moynihan等人. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab*. 2005; 2(2): 105-117和Bordone等人. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*. 2006; 4(2): e31)。鉴于此并且基于本文提供的发现,芪类化合物(优选白藜芦醇或紫檀芪)与水飞蓟宾组合或根据第二方面的组合物也可以用于治疗、预防、改善或减少糖尿病。优选地,芪类化合物是紫檀芪。因此,在一个优选的实施方式中,本发明还提供了用于治疗、预防、改善或减少糖尿病的与水飞蓟宾或其盐组合的紫檀芪或其盐,其中该组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、和b) 水飞蓟宾或其盐。

[0140] 该第七方面与上述第一方面和第二方面相关。因此,化合物和药物组合物、施用用量、途径和时间表根据本发明的前述方面提供并且在此处适用。

[0141] 与第一方面中所定义的类似,并且也包括在第五、第六和第七方面中的实施方式中,PT与SIL的组合可以在单独的组合物中或在分开的组合物中施用。在第五、第六和第七方面的实施方式中,紫檀芪是紫檀芪磷酸二钠盐。在所述方面的其他优选的实施方式中,水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2', 3-二氢琥珀酸二钠盐。值得注意的是,在任何上述方面中描述的用途还包括将PTE和SIL与至少一种另外的辐射缓和剂化合物组合施用,其中本文中描述的用途被理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐、b) 水飞蓟宾或其盐、和c) 一种或多种辐射缓和剂化合物。在优选的实施方式中,至少一种或多种辐射缓和剂化合物是指烟酰胺腺嘌呤二核苷酸加强剂(以下称为NAD⁺加强剂)和/或成纤维细胞刺激性脂肽-1(以下称为FSL-1)或其任何盐。

[0142] 与第一方面中所定义的类似,并且也包括在第五、第六和第七方面中的实施方式中,将PT与SIL、或其任何盐或衍生物施用于对象。在优选的实施方式中,对象是哺乳动物。优选地,哺乳动物是人类或家畜例如狗、猫或马。更优选地,哺乳动物是人类。

[0143] 本发明还提供了用于增加对象中去乙酰化酶的细胞内水平以预防、治疗(包括改善或减少)对象中以具有低去乙酰化酶水平、去乙酰化酶激活降低为特征的疾病的方法,如前述方面中所述。在一个实施方式中,该方法包括施用紫檀芪与水飞蓟宾、或其任何盐的组

合,其中该组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其盐,b) 水飞蓟宾或其盐,和任选地,c) 提供至少一种或多种辐射缓和剂化合物,如本说明书全文所定义。与如上所述类似,至少一种或多种辐射缓和剂化合物可以是NAD⁺加强剂和/或FSL-1。重要的是,第一方面中定义的用量和施用途径也适用于根据第五、第六和第七方面的用途。

[0144] 本文值得注意的是,本发明还针对以下条款或实施方式:

[0145] 1. 用于预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的紫檀芪或其药学上可接受的盐,其与水飞蓟宾或其药学上可接受的盐组合,其中施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行;并且其中所述组合在此处理解为以任何顺序同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。

[0146] 2. 根据条款1所述的用途的紫檀芪,其中紫檀芪和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以单一药物组合物或分开的药物组合物施用。

[0147] 3. 根据条款1至2中任一项所述的用途的紫檀芪,其中紫檀芪和水飞蓟宾或其药学上可接受的盐的施用是局部、口服或肠胃外施用。

[0148] 4. 根据条款1至3中任一项所述的用途的紫檀芪,其中将紫檀芪和水飞蓟宾、或其药学上可接受的盐在辐射之前和/或之后或两者,同时或依次施用数次。

[0149] 5. 根据条款1至4中任一项所述的用途的紫檀芪,其中组合的用量能够提供辐射防护作用。

[0150] 6. 根据条款1至5中任一项所述的用途的紫檀芪,其中紫檀芪或其药学上可接受的盐以300mg/kg至30mg/kg、优选100mg/kg的用量施用,水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以200mg/kg至35mg/kg水飞蓟宾、优选70mg/kg的用量施用,或者换算成人类的等效剂量。

[0151] 7. 根据条款1至6中任一项所述的用途的紫檀芪,其中该用途还包括与至少一种或多种辐射缓和剂化合物组合施用,其中该组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐、和c) 至少一种或多种辐射缓和剂化合物或其任何药学上可接受的盐。

[0152] 8. 根据条款7所述的用途的紫檀芪,其中至少一种或多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和/或成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。

[0153] 9. 根据条款7所述的用途的紫檀芪,其中该用途还包括与至少两种或更多种辐射缓和剂化合物组合施用,其中该至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽、或其任何药学上可接受的盐。

[0154] 10. 根据条款7至9中任一项所述的用途的紫檀芪,其中NAD⁺加强剂或其任何药学上可接受的盐以400mg/kg至100mg/kg、优选185mg/kg的用量施用,和/或其中成纤维细胞刺激性脂肽或其药学上可接受的盐以1mg/kg至0.1mg/kg、优选0.25mg/kg的用量施用,或者换算成人类的等效剂量。

[0155] 11. 根据条款8至10中任一项所述的用途的紫檀芪,其中NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0156] 12. 根据条款1至11中任一项所述的用途的紫檀芪,其中电离辐射诱发的疾病与DNA损伤、辐射诱发的细胞毒性、基因毒性和/或氧化细胞损伤有关。

[0157] 13. 根据条款1至12中任一项所述的用途的紫檀芪,其中电离辐射诱发的疾病是急性辐射综合征和/或慢性辐射综合征。

[0158] 14. 根据条款1至13中任一项所述的用途的紫檀芪,其中电离辐射是 γ 射线或X射线。

[0159] 15. 根据条款1至14中任一项所述的用途的紫檀芪,其中紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或其中水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

[0160] 16. 药物组合物,包含a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。

[0161] 17. 根据条款16所述的药物组合物,其中紫檀芪或其药学上可接受的盐以300mg/kg至30mg/kg、优选100mg/kg的用量存在于所述组合物中,并且其中水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以200mg/kg至35mg/kg水飞蓟宾、优选70mg/kg的用量存在于所述组合物中,或者换算成人类的等效剂量。

[0162] 18. 根据条款16和17中任一项所述的药物组合物,其中该药物组合物还包含至少一种或多种辐射缓和剂化合物,该辐射缓和剂化合物优选地选自:

[0163] a. NAD⁺加强剂,和/或

[0164] b. 成纤维细胞刺激性脂肽-1,

[0165] 或其任何药学上可接受的盐。

[0166] 19. 根据条款18所述的药物组合物,其中该药物组合物还包括至少两种或更多种辐射缓和剂化合物,其中该至少两种或更多种辐射缓和剂化合物是NAD⁺加强剂和成纤维细胞刺激性脂肽-1、或其任何药学上可接受的盐。

[0167] 20. 根据条款18至19中任一项所述的药物组合物,其中NAD⁺加强剂或其药学上可接受的盐以400mg/kg至100mg/kg、优选185mg/kg的用量存在于所述组合物中,和/或其中成纤维细胞刺激性脂肽-1或其药学上可接受的盐以1mg/kg至0.1mg/kg、优选0.25mg/kg的用量存在于所述组合物中,或者换算成人类的等效剂量。

[0168] 21. 根据条款18至20中任一项所述的药物组合物,其中NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0169] 22. 根据条款16至21中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体、添加剂和/或赋形剂。

[0170] 23. 根据条款16至22中任一项所述的药物组合物,其中紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或其中水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

[0171] 24. 多部分试剂盒,包括至少两个容器,该至少两个容器包含至少紫檀芪和水飞蓟宾、或其任何药学上可接受的盐,以及任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物。

[0172] 25. 根据条款24所述的多部分试剂盒,其中紫檀芪或其药学上可接受的盐以300mg/kg至30mg/kg、优选100mg/kg的用量存在,并且水飞蓟宾或其药学上可接受的盐以200mg/kg至35mg/kg水飞蓟宾、优选70mg/kg的用量存在,或者换算成人类的等效剂量。

[0173] 26. 根据条款24和25所述的多部分试剂盒,其中任选的至少一种或多种辐射缓和剂化合物选自以下的组:

[0174] a. NAD⁺加强剂,和/或

[0175] b. 成纤维细胞刺激性脂肽,

[0176] 或其任何药学上可接受的盐。

[0177] 27. 根据条款26所述的多部分试剂盒,其中NAD⁺加强剂或其药学上可接受的盐以400mg/kg至100mg/kg、优选185mg/kg的用量存在,和/或其中成纤维细胞刺激性脂肽或其药

学上可接受的盐以1mg/kg至0.1mg/kg、优选0.25mg/kg的用量存在,或者换算成人类的等效剂量。

[0178] 28. 根据条款26和27中任一项所述的多部分试剂盒,其中NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0179] 29. 根据条款24至27中任一项所述的多部分试剂盒,其中紫檀芪为紫檀芪磷酸二钠盐,和/或其中水飞蓟宾为水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐。

[0180] 30. 预防、改善或减少对象中电离辐射诱发的疾病的方法,包括:施用紫檀芪和水飞蓟宾、或其药学上可接受的盐的组合,其中所述施用在辐射之前、或辐射之后、或辐射期间进行;并且其中该组合在此处理解为同时或依次向所述对象施用a) 紫檀芪或其药学上可接受的盐、和b) 水飞蓟宾或其药学上可接受的盐。

[0181] 31. 根据条款30所述的方法,还包括施用至少一种辐射缓和剂化合物,其中所述至少一种或多种辐射缓和剂化合物优选地选自:

[0182] a. NAD⁺加强剂,和/或

[0183] b. 成纤维细胞刺激性脂肽,

[0184] 或其任何药学上可接受的盐。

[0185] 32. 根据条款31所述的方法,其中所述NAD⁺加强剂是烟酰胺核苷。

[0186] 应当理解,实施方中描述的具体实施方式是通过说明的方式示出的,而不是作为对本发明的限制。在不脱离本发明的范围的情况下,可以在各种实施方式中采用本发明的主要特征。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的具体过程的许多等同物。这些等同物被认为在本发明的范围内并且由权利要求书覆盖。

[0187] 实施例

[0188] 实施例1:一般材料和方法

[0189] 本文公开了本发明中使用的一般材料和方法。具体程序在实施例2至4的每一个中进一步描述。

[0190] 小鼠和处理程序

[0191] 瑞士白化小鼠(雄性,9-10周龄,30-32克)获自Charles River Laboratories(马萨诸塞州,威尔明顿)。该品系是辐射研究中最常用的品系之一(Williams 2010)。在辐照前给小鼠喂食全营养饮食(标准饮食,SD)。此即Panlab(西班牙,巴塞罗那)的A03,其具有3200千卡/千克,和以下的营养组成:粗蛋白,23.5%;粗脂肪4.3%;粗纤维,3.7%;和碳水化合物,51.1%;提供与用于大鼠和小鼠的NIH-7开放配方相同的维生素和矿物质。这种饮食符合美国营养研究所建议的成年小鼠膳食摄入量。这些动物自由采食并饲养在单独的代谢笼中,每天监测体重和食物摄入量。动物室保持在22°C,12小时光照/12小时黑暗循环。还允许自由摄入饮用水。受辐照小鼠的护理遵循罗伯特伍德约翰逊医学院(新泽西州皮斯卡塔韦)关于小鼠全身辐照的建议(策略15),其中包括:a) 在饮用水中使用抗生素(134mg氨苄青霉素/kg/天、40mg拜有利/kg/天和220/42mg磺胺甲恶唑/甲氧苄氨嘧啶/kg/天),b) 使饮用水易于获取,c) 在前14天期间在笼子底部提供Napa nectar(Systems Engineering Lab Group Inc.,加利福尼亚州纳帕)并每天更换,d) 在笼子地板上的小培养皿中提供软化的食物,e) 完全无菌的环境(笼子、食物和水)以避免潜在的免疫抑制相关感染。笼内还包括一个独立的轮子,以方便动物身体锻炼。所有实验均在10点开始,以尽可能减少可能的昼夜节律

变化。涉及动物的程序符合国际法律和政策 (EEC Directive 86/609, OJ L 358.1, 1987年12月12日; 和NIH实验动物的护理和使用指南, NIH Publ.No.85-23, 1985)。小鼠在BIOBEAM 8000 (Gamma-Service Medical GmbH, 德国莱比锡) 中接受 γ 辐射 (^{137}Cs) (全身辐照, TBI)。单次放疗, 总剂量范围约为5.0至10.0Gy, 以约5.0Gy/min的速率施用。与源的辐照距离限制为12cm。使用Bruker (马萨诸塞州比勒利卡) 的丙氨酸剂量计控制辐射剂量测定, 剂量测定变化为 $\pm 0.09\text{Gy}$ 。对于口服施用, 将PTER和SIL (Merck Chemicals GmbH, 德国达姆施塔特) 溶解在2-羟丙基- β -环糊精中, 然后在0.3%羧甲基纤维素中悬浮。对于腹膜内施用, 将PTER盐 (紫檀芪磷酸二钠盐, SYNCOM, 荷兰格罗宁根) 和SIL盐 (水飞蓟宾-C-2', 3-二氢琥珀酸二钠盐, Rottapharm/Madaus, 德国科隆) 溶解于无菌疫苗级水。测定的所有其他多酚植物化学物质 (Merck Chemicals GmbH; 和Cayman Chemical Co., 密歇根州安阿伯) 代表主要的类黄酮和非类黄酮 (Estrela 2017), 即没食子酸 (一种酚酸)、咖啡酸 (一种羟基肉桂酸)、姜黄素 (一种姜黄素类化合物)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (一种黄烷醇)、染料木素 (一种异黄酮)、槲皮素 (一种黄酮醇)、木犀草素 (一种黄酮)、柚皮素 (一种黄烷酮)、飞燕草素 (一种花青素) 和根皮苷 (一种查耳酮), 在口服施用前如PTER和SIL那样进行溶解 (Wani 2016)。将NR (烟酰胺核苷, 3-氨基羰基-1- β -D-呋喃核糖基-吡啶鎓, ElysiumHealth, Inc., 纽约州纽约) 溶解在疫苗级水中, 在口服前使溶液的pH值中和 (pH 7.0) (185mg/kg $\times$ 天, Obrador 2020)。将FSL-1 (InvivoGen, 加利福尼亚州圣地亚哥) 重悬于无菌疫苗级水中, 并腹膜内施用 (按照Kurkjian 2017的建议, 0.25mg/kg $\times$ 天, 施用体积为50至60mL, 具体取决于小鼠的体重)。药用级氨磷汀 (Ethyol) 购自Cumberland Pharmaceuticals (田纳西州纳什维尔), 为500mg无菌冻干粉末小瓶, 生理盐水复溶后使用。

[0192] 病理学

[0193] 将死亡、垂死或计划处死的小鼠从研究中剔除。对所有小鼠进行尸检, 收集大约30个组织或器官以及所有肉眼病变进行显微镜检查。在10%中性缓冲的福尔马林中固定后, 对所有组织进行常规处理并用苏木精和伊红染色以进行组织病理学评估。

[0194] 辐照后14天, 对小鼠实施安乐死, 分离股骨。使用26号针用预冷的磷酸盐缓冲盐水从分离的股骨中冲下骨髓细胞。通过轻轻吹打冲下来的细胞多次来制备单细胞悬浮液, 并使用血细胞计数器 (Neubauer, 德国马林费尔德) 对活骨髓有核细胞 (BMNC) 的数量进行计数并表示为 $\times 10^6$ /股骨。

[0195] 旋转棒测试

[0196] 测试功能包括评估对象的平衡力、抓握力和运动协调性; 尤其是在测试实验药物的效果方面。对于此测试 (Rota Rod, Harvard Apparatus, 马萨诸塞州霍利斯顿), 每只动物进行了3次试验, 测量了其在旋转轴 (直径3.5cm; 旋转速度: 15rpm) 上保持不跌落的最长持续时间 (秒)。每只小鼠在1200秒的任意极限内最多可以尝试3次, 并记录最长的时间。每周监测不同组随时间的变化。

[0197] 紫檀芪水平

[0198] 如先前所述 (Ferrer 2005), 使用配备有Shimadzu LC-10ADvp泵和带有SIL-10ADvp自动进样器的SLC-10Avp控制器系统的TSQ VantageTM三重四极杆质谱仪 (Thermo Fisher Scientific) 进行液相色谱和质谱 (LC-MS/MS)。

[0199] 水飞蓟宾水平

[0200] 测量基于Song等人(2019)描述的方法。简而言之,在Hypurity™ C18色谱柱(50×4.6mm)上使用5μL进样体积通过HPLC(Ultimate3000,ThermoFisherScientific)和MS/MS(Waters TQ检测器三重四极杆)系统对样品进行分析。流动相由水(A)和乙腈(B)组成。梯度洗脱体系优化如下:0至3.0min 20%至100%B,3.0至5.0min 100%-100%B,5.0至5.5min 100%至20%B,5.5至7.5min 20%B。流速为0.5mL/分钟。MS/MS数据采集在负电喷雾电离模式下进行。采用多反应监测模式来监测SIL,母离子到产物离子的转变为m/z 481.3/125.0。碎裂电压为150V,碰撞能量为15eV。组织样品制备如针对PTER水平测定所述(上文)。

[0201] 血液NAD⁺水平

[0202] 按照Yoshino和Imai(Yoshino等人.2013)描述的方法,通过HPLC测量全血中的NAD⁺水平。在该过程中,使用配备有Supelco LC-18-T柱(15cm×4.6cm;Sigma Aldrich)和Hypercarb柱(15cm×4.6cm;Thermo Fisher Scientific,马萨诸塞州沃尔瑟姆)的HPLC系统(Shimadzu,日本京都)。全血样本(0.5ml)在4℃下收集在柠檬酸钠管中。然后将0.1ml的全血等分试样转移至含有0.9ml 0.5M冰冷高氯酸的冷冻管中以裂解所有血细胞。样品以10,000g离心10分钟(4℃)。上清液储存于-80℃直至分析。

[0203] 治疗诱发的体内毒性的评估

[0204] 这包括基于NIH标准方法的血细胞计数和化学分析。

[0205] 染色体畸变和双链DNA断裂

[0206] 遵循M'kacher等人(2015)描述的技术,其中端粒和着丝粒染色有助于使用优化的杂交条件和间期染色体的融合捕获来轻松检测淋巴细胞中早熟染色体凝集的双着丝粒、着丝粒环和无着丝粒染色体。这种方法呈现的主要优点是因为可以在采血后数小时内观察到损伤。按照程序中的建议(M'kacher 2015)在辐照后8小时采血,从而为DNA修复以及双着丝粒、着丝粒环和无着丝粒染色体的出现提供了时间。

[0207] 如下文所述分离外周血淋巴细胞。如先前所述(Pantelias1983)使用CHO细胞(ATCC)进行早熟染色体凝集(PCC)。根据形态特征,将凝集的人染色体与CHO染色体区分开来(M'kacher 2015)。此过程大约需要4小时。

[0208] 使用Q-FISH技术对PCC融合体的端粒和着丝粒进行染色,其中使用对端粒TTAGGG特异的Cy-3标记的肽核酸(PNA)探针和对着丝粒序列特异的荧光素异硫氰酸盐标记的PNA探针(M'kacher 2015)(均来自ThermoFisher Scientific,马萨诸塞州沃尔瑟姆)。使用Metasystems(德国阿尔特卢斯海姆)的Autocapt软件和高分辨率CCD相机(C91002-23B,Hamamatsu Photonics,德国赫尔辛)自动记录端粒和着丝粒染色的融合体。

[0209] 在相同载玻片中,按照M'kacher等人(2015)的描述进行了两种不同的手动程序。简而言之,首先使用反式4',6-二脒基-2-苯基吲哚,对环和过多无着丝粒染色体进行评分。其次,采用端粒和着丝粒染色,对双着丝粒、着丝粒环、以及来自无端粒染色的中间缺失的无着丝粒染色体、仅具有1个端粒的无着丝粒染色体(代表末端缺失)、和具有2个端粒的无着丝粒染色体(源自2个无着丝粒染色体的融合体,伴随双着丝粒或无着丝粒环形成)进行评分,计算产生的双链DNA断裂(DSB)(M'kacher 2015)。

[0210] 微核形成

[0211] 为此目的,从处死的小鼠中收集股骨骨髓,制备涂片并使用甲醇固定。干燥后,使用MayGrunwald和Giemsa染色剂(Schmid 1975)进行双重染色。根据该方法,多染性红细胞

(PCE) 染成红蓝色,正染性红细胞(NCE)染成橙色,而细胞核物质呈深紫色。在油浸下从2000个细胞中计数微核的多染(MnPCE)细胞和微核的正染(MnNCE)细胞。

[0212] 淋巴细胞、肝细胞和肠上皮细胞的分离和孵育

[0213] 根据先前报道的方法(Berry1969)进行肝细胞的分离。通过Accuspin-Histopaque (Sigma-Aldrich,密苏里州圣路易斯)梯度离心从肝素化血液中获得血液单个核细胞。将单个核细胞洗涤两次并以 20×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于含有0.3%牛血清白蛋白的Krebs-Henseleit碳酸氢盐培养基(pH7.4)中。如其他地方所述(Thornton2003),在4℃下通过单分散免疫磁性Dynabead (Dyna1)对淋巴细胞亚群进行进一步阳性选择。如先前描述的(Estrela1992),获得肝细胞和淋巴细胞体积。

[0214] 将分离的肝细胞在含有1.3mM- CaCl_2 、5%脱脂牛血清白蛋白并且存在葡萄糖(5mM)的Krebs-Henseleit碳酸氢盐培养基(KHBM,pH7.4)中于37℃下在烧瓶(约10mg干重/ml)中进行孵育。气体气氛为 O_2/CO_2 (19:1)。将分离的淋巴细胞(10^6 个细胞/烧瓶)在含有5%脱脂牛血清白蛋白并且存在葡萄糖(5mM)和谷氨酰胺(2mM)的Krebs-Ringer培养基中于37℃下孵育。孵育后,通过添加0.2ml 25%高氯酸破坏细胞。离心去除蛋白质,上清液用20ml 40%KOH溶液和Tris-(羟甲基)氨基甲烷/KOH(0.5至2.0M)溶液中和,用于测量代谢物。

[0215] 使用Graves等人(2014)改编的方案分离原代肠上皮细胞(IEC)。通过除去纵向肌肉层并用含有100U青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素和0.5mM二硫苏糖醇(DTT)的冰冷的无 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 汉克平衡盐溶液(HBSS)洗涤来制备结肠组织。将组织切成小块,悬浮于50ml HBSS洗涤溶液中并摇动,并使内容物沉降2分钟。除去上清液并将沉降的内容物洗涤3次。将沉淀的内容物切碎并悬浮于HBSS中。将所得悬浮液通过1000 μm^2 筛网过滤器。剩余组织在缓冲液中消化,该缓冲液含有75U/ml XI型胶原酶(Sigma-Aldrich)、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分散酶中性蛋白酶II(Thermo Fisher Scientific,马萨诸塞州沃尔瑟姆)、0.5mM DTT和2%v/v胎牛血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific)在杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)(Sigma-Aldrich)中的溶液。然后将含有组织的消化缓冲液放入37℃培养箱中,并以200rpm的速度振荡2小时。将所得消化混合物再次通过1000 μm^2 过滤器,并用25ml完全生长培养基(DMEM、8.5g/l丙酮酸钠、2%v/vFBS、0.25U/ml胰岛素、100U青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 转铁蛋白和含有2%w/v D-山梨糖醇的10ng/ml EGF)洗涤过滤器顶部的组织碎片。丢弃过滤器中残留的组织碎片,并将含有增殖性隐窝结构的流出物在4℃下以200g离心5分钟。将含有分离的肠隐窝的剩余沉淀物悬浮在DMEM中。将隐窝悬浮在完全生长培养基中,以约2000个隐窝/ml/孔的密度在12孔I型胶原蛋白包被培养皿(ThermoFisher Scientific)中铺布,并在37℃, O_2/CO_2 (19:1)下孵育。

[0216] 葡萄糖和谷氨酰胺利用率如先前所述进行测量(Newsholme1987)。

[0217] 细胞培养

[0218] 将分离的肝细胞以 10^6 个细胞/mL的浓度在William完全培养基中培养。将分离的C2D⁺淋巴细胞以 2×10^6 个细胞/mL的浓度在PB-MAX培养基(GIBCO,ThermoFisher Scientific)中培养。将IEC(10^6 个细胞/mL)在补充有10%热灭活FBS和300mg/ml L-谷氨酰胺的DMEM中培养。所有细胞均在37℃、95%空气和5% CO_2 的潮湿气氛中培养。

[0219] DNA氧化

[0220] 将组织样品在10mM Tris(pH7.0)+1mM EDTA+150mM NaCl中匀浆。此后,它们首先

与RNase A在37℃下孵育30分钟,然后与蛋白酶K在55℃下孵育过夜。随后进行氯仿/异戊醇萃取。用核酸酶P1和碱性磷酸酶将100μg分离的DNA样品消化成核苷(Crain1990)。通过UPLC-MS/MS完成修饰的DNA碱基8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8OHdG)的分析。

[0221] 脂质过氧化

[0222] 对于异前列烷测定,将组织样品在0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.4)+1mM EDTA+0.005%丁基化羟基甲苯中匀浆。使用8-异前列烷EIA试剂盒(Cayman Chemical Co.)并遵循制造商的方案测量异前列腺素。

[0223] 蛋白质羰基化

[0224] 蛋白质的羰基化是一种不可逆的氧化损伤,使用蛋白质羰基荧光测定试剂盒(Cayman Chemical Co.)并遵循制造商的方案进行测量。

[0225] 酶活性和代谢水平

[0226] 分离的细胞在4℃下于0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.2)中匀浆。如先前详细描述,测量了γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶1和2(SOD1和SOD2)活性(Benlloch 2016)。使用Pierce BCA蛋白质测定法(Thermo Fisher Scientific)确定蛋白质浓度。如先前报道的,通过LC/MS测定谷胱甘肽(γ-L-谷氨酰-L-半胱氨酸-甘氨酸,GSH)(Obrador 2014)。细胞处理根据已发表的方法进行,其中使用快速N-乙基马来酰亚胺衍生化来防止GSH自动氧化(Asensi1994)。使用MyBiosource(加利福尼亚州圣地亚哥)的检测试剂盒对分离的细胞中的NAD和NADH进行定量。

[0227] RT-PCR和mRNA检测

[0228] 按照制造商的说明,使用Invitrogen(加利福尼亚州圣地亚哥)的TRIzol试剂盒分离总RNA。使用随机六聚体引物和MultiScribe逆转录酶试剂盒按照制造商的推荐(Taq-Man RT Reagents;Applied Biosystems,加利福尼亚州福斯特城)获得cDNA。PCR主混合物和AmpliTaqGoldDNA聚合酶(Applied Biosystems)添加到先前报道的引物中(Benlloch 2016)。如之前报道的那样,相对于3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)进行mRNA实时定量(Benlloch 2016)。

[0229] 彗星测定

[0230] 该测定是一种单细胞凝胶电泳测定,用于简单评估细胞DNA损伤。我们使用Abcam(英国剑桥)的检测试剂盒(ab238544)。遵循制造商的说明书一步一步地进行。

[0231] 烟酰胺磷酸核糖基转移酶活性测定

[0232] 可以通过在丙酮中的¹⁴C-NMN沉淀在滤纸上并闪烁计数来测量从¹⁴C-烟酰胺(NAM,(GE Healthcare Life Sciences,Björkgatan,瑞典乌普萨拉))形成¹⁴C-烟酰胺单核苷酸(NMN)。细胞分散通过胰蛋白酶法(在补充有0.2%胰蛋白酶、0.5mM EDTA和5mM葡萄糖的无Mg²⁺-和Ca²⁺-的PBS中,37℃下3分钟)进行。通过离心(800g×5分钟,4℃)获得细胞沉淀物,然后将100μl磷酸盐缓冲液[0.01MNa₂HPO₄/NaH₂PO₄缓冲液,pH 7.4,含有蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich)]添加到每个细胞样品中。对样品进行进一步处理,如先前所述,根据30μg蛋白质测定NAMPT活性(ElliottGC等人,1980;SchusterS等人,2014)。使用Perkin-Elmer的Tri-Carb®液体闪烁计数器测量放射性(崩解/分钟)。从每次测量中减去闪烁液背景崩解/分钟。

[0233] 骨髓中的集落形成细胞

[0234] 在无菌条件下处死小鼠并在辐照后第7天分离股骨。用补充有5%胎牛血清的磷酸盐缓冲盐水(4℃)从分离的股骨(见上文)中冲下骨髓细胞。单细胞悬液通过100μm尼龙网过滤器以去除碎片和团块。用磷酸盐缓冲盐水(4℃)洗涤细胞两次,并使用血细胞计数器进行计数。根据制造商的方案,将细胞以每35mm细胞培养皿 5×10^4 个细胞的浓度离体铺布在Methocult GF M3434(Stemcell Technologies,加拿大温哥华)生长培养基中,并在37℃、5%CO₂、95%湿度下孵育14天。培养第14天,使用光学显微镜(AxioCam MRc5,Zeiss,德国上科亨)在偏振光下观察集落,并在60mm网格评分培养皿(Stemcell Technologies)中扫描。对造血集落形成细胞CFU-GM和CFU-GEMM进行定量。

[0235] 细胞、细胞核和线粒体提取物的制备

[0236] 使用Sigma Aldrich的全细胞提取试剂盒制备细胞提取物。NE-PER™细胞核和细胞质提取试剂盒(ThermoFisherScientific)可逐步从哺乳动物细胞或组织分离细胞质和细胞核提取物。线粒体提取物是按照Thermo Fisher Scientific标准化的细胞分级和细胞器分离程序制备的。

[0237] 基因沉默

[0238] 使用来自Ambion Inc.(德克萨斯州奥斯汀)的PSilencer 3.1-H1线性载体获得长期基因沉默。为了靶向小鼠Nfkbie,使用来自Origen(马里兰州洛克维尔)的siRNA Oligo Duplex(Locus ID 18037)。靶向小鼠Nfe2l2(RefSeq NM_010902.3)、Ppargc1(RefSeq NM_008904.2)、Sirt1(RefSeq NM_019812.2)、Sirt3(RefSeq MN_022433.2)、Parp1(RefSeq NM_007415.2)、SOD2(RefSeq NM_013671.3)和GPX1(RefSeq NM_008160.6)的siRNA来自Invitrogen。

[0239] 在所有情况下,沉默程序均遵循制造商的技术建议。使用等量的相应有义寡核苷酸以及具有相同碱基组成和随机序列的乱序寡核苷酸进行对照实验。通过免疫印迹证实沉默。使用Invitrogen Lipofectamine RNAiMAX转染试剂和制造商的方案来递送siRNA。

[0240] 细胞死亡分析

[0241] 通过使用荧光显微术区分凋亡细胞死亡和坏死细胞死亡。为此,将分离的MN与Hoescht 33342(10mM;对所有细胞核染色)和碘化丙啶(10mM;对质膜破裂的细胞的细胞核染色)孵育3分钟,并使用Diaphot300荧光显微镜(Nikon,日本东京)在360nm的激发波长下进行分析。活细胞、坏死细胞和凋亡细胞的细胞核分别观察为蓝色圆形细胞核、粉色圆形细胞核和碎片状蓝色或粉色细胞核。每次计数约1000个细胞。

[0242] 蛋白质印迹

[0243] 如先前所述,进行蛋白质印迹分析(BenllochM等人,2016)。将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,并用特异性抗人单克隆抗体(OriGene,Rockville,MD;和Abcam)进行蛋白质印迹。使用辣根过氧化物酶缀合的二抗和增强化学发光(ECL系统;GE HealthCare Life Sciences)使印迹显影。使用激光密度测定对蛋白质条带进行定量。

[0244] 肿瘤异种移植

[0245] 人A549和MDA-MB-231细胞来自ATCC(弗吉尼亚州马纳萨斯)。细胞在补充有10%热灭活的FCS(BiochromKG,柏林,德国)、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM(pH7.4)(Invitrogen,加利福尼亚州圣地亚哥)中生长。将细胞铺板($20,000$ 个细胞/cm²)并在37℃、

具有5%CO₂的潮湿气氛中培养。通过将细胞与含0.3mM EDTA的0.05% (w/v) 胰蛋白酶 (Sigma Aldrich, 密苏里州圣路易斯) 在含有0.3mM EDTA的PBS (pH7.4) 中孵育5分钟, 然后添加10%FCS使胰蛋白酶失活, 收获细胞。在添加任何处理之前, 让细胞贴壁12小时。使用BioRad (加利福尼亚州赫拉克勒斯) TC20自动细胞计数器确定细胞数量和活力。裸 (nu/nu) 小鼠 (雄性, 9至10周龄, Charles River Laboratories, 马萨诸塞州威尔明顿) 按标准饮食 (Letica, 密歇根州罗切斯特山) 自由地采食, 并保持12小时光照/12小时黑暗循环, 室温为22℃。程序符合国际法律和政策 (EEC Directive 86/609, OJ L 358.1, 1987年12月12日; 和NIH实验动物的护理和使用指南, NIH Publ.No.85-23, 1985)。通过暴露于0.02%EDTA (37℃下5分钟) 从培养瓶中收获肿瘤细胞, 在DMEM中洗涤两次, 重悬于相同的培养基中, 并皮下注射到动物背部 (5×10^6 个细胞/小鼠)。从处理第二天开始, 每两天使用卡尺测定局部肿瘤生长。

[0246] 统计学

[0247] 数据表示为不同实验次数的平均值±标准偏差。使用学生t检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0248] 使用G*Power3.1.9.2软件确定样本大小 (ANOVA检验, 效应大小=0.21, $\alpha=0.05$, $\beta=0.80$ 和指定组)。使用Kaplan-Meier曲线和LogRank (Mantel-Cox) 检验分析生存数据。

[0249] 参考文献

[0250] Asensi, M. et al. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 217, 323-328 (1994).

[0251] Benlloch M, et al. Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo: A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal*. 2016; 24:974-90

[0252] Berry, M.N., and Friend, D.S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*. 43, 506-520.

[0253] Benlloch, M., Obrador, E., Valles, S.L., Rodriguez, M.L., Sirerol, J.A., Alcácer, J., Pellicer, J.A., Salvador, R., Cerdá, C., Sáez, G.T., and Estrela, J.M. (2016) Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo: A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid. Redox Signal*. 24, 974-990.

[0254] Boehning, D., Sedaghat, L., Sedlak, T.W. & Snyder, S.H. Heme Oxygenase-2 Is Activated by Calcium-Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 279, 30927-30930 (2004).

[0255] Cantó C, Sauve AA, Bai P. Crosstalk between poly (ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Mol Aspects Med*. 2013 Dec; 34(6):1168-201.

[0256] Crain, P.F. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 193:782-790; 1990.

[0257] Elliott GC, et al. A rapid procedure for assaying nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Anal Biochem*. 1980; 107:199-205;

- [0258] Estrela JM, Hernandez R, Terradez P, Asensi M, Puertes IR, and Vina J. Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem J* 286(Pt 1):257-262, 1992.
- [0259] Estrela JM, Mena S, Obrador E, Benlloch M, Castellano G, Salvador R, Dellinger RW. Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. *J Med Chem*. 2017 Dec 14; 60(23):9413-9436.
- [0260] Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, Varea MT, Asensio G, Jorda L, and Estrela JM. Association between PTERostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia* 7:37-47, 2005.
- [0261] Fischer N, Seo EJ, Efferth T. Prevention from radiation damage by natural products. *Phytomedicine*. 2018 Aug 1; 47:192-200.
- [0262] Graves CL, Harden SW, LaPato M, Nelson M, Amador B, Sorenson H, Frazier CJ, Wallet SM. A method for high purity intestinal epithelial cell culture from adult human and murine tissues for the investigation of innate immune function. *J Immunol Methods*. 2014 Dec 1; 414:20-31.
- [0263] Groen, A. K., Sips, H. J., Vervoorn, R. C., and Tager, J. M. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 87-93.
- [0264] Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, Salloum RM, Hautamaki RD, Plumley DA, Mendenhall WM, Bova FJ, Khan SR, Hackett RL, Bland KI, Copeland III EM. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*. 1990 Jul 1; 66(1):62-8.
- [0265] Kurkjian CJ, Guo H, Montgomery ND, Cheng N, Yuan H, Merrill JR, Sempowski GD, Brickey WJ, Ting JP. The Toll-Like Receptor 2/6 Agonist, FSL-1 Lipopeptide, Therapeutically Mitigates Acute Radiation Syndrome. *Sci Rep*. 2017 Dec 11; 7(1):17355.
- [0266] Martens CR, Denman BA, Mazzo MR, Armstrong ML, Reisdorph N, McQueen MB, Chonchol M, Seals DR. Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD⁺ in healthy middle-aged and older adults. *Nat Commun*. 2018 Mar 29; 9(1):1286.
- [0267] Mavragani IV, Laskaratou DA, Frey B, Candéias SM, Gaip US, Lumniczky K, Georgakilas AG. Key mechanisms involved in ionizing radiation-induced systemic effects. A current review.
- [0268] *Toxicol Res (Camb)*. 2015 Aug 11; 5(1):12-33.
- [0269] M'kacher R, El Maalouf E, Terzoudi G, Ricoul M, Heidingsfelder L, Karachristou I, Laplagne E, Hempel WM, Colicchio B, Dieterlen A, Pantelias G, Sabatier L. Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in nonstimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes after telomere and centromere staining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Mar 1; 91(3):640-9.

- [0270] Newsholme,P.,Gordon,S.,and Newsholme,E.A. (1987) Rates of utilization and fates of glucose,glutamine,pyruvate,fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages.Biochem.J.242,631-636.
- [0271] Obrador,E.,Valles,S.L.,Benlloch,M.,Sirerol,J.A.,Pellicer,J.A.,Alcácer,J.,Coronado,J.A.-F.,and Estrela,J.M. (2014) Glucocorticoid receptor knockdown decreases the antioxidant protection of B16 melanoma cells: an endocrine system-related mechanism that compromises metastatic cell resistance to vascular endothelium-induced tumor cytotoxicity.PloS One.9, e96466.
- [0272] Obrador E,Salvador R,Marchio P,López-Blanch R,Jihad-Jebbar A,Rivera P,Vallés SL,Banacloche S,Alcácer J,Colomer N,Coronado JA,Alandes S,Drehmer E,Benlloch M,Estrela JM.Nicotinamide Riboside and Pterostilbene Cooperatively Delay Motor Neuron Failure in ALS SOD1G93A Mice.Mol Neurobiol.2020 Nov 10.doi:10.1007/s12035-020-02188-7.
- [0273] Pantelias GE,Maille HD.A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol.Somat Cell Genet 1983;9:533-547.
- [0274] Patyar RR,Patyar S.Role of drugs in the prevention and amelioration of radiation induced toxic effects.Eur J Pharmacol.2018 Jan 15;819:207-216.
- [0275] Riklis E,Kol R,Marko R.Trends and developments in radioprotection:the effect of nicotinamide on DNA repair.Int J Radiat Biol.1990 Apr;57(4):699-708.
- [0276] Qi Z,Whitt I,Mehta A,Jin J,Zhao M,Harris RC,et al.Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance.Am J Physiol Renal Physiol.2004;286:F590-596.
- [0277] Reisz JA,Bansal N,Qian J,Zhao W,Furdui CM.Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection.Antioxid Redox Signal 2014,21:260-92.
- [0278] Riley,P.A.,1994.Free radicals in biology:oxidative stress and the effects of ionizing
- [0279] radiation.Int.J.Radiat.Biol.65,27-33.
- [0280] Schmid W.1975.The micronucleus test.Mutat Res Mutagen Relat Subj.31: 9-15.
- [0281] Sirerol JA,Feddi F,Mena S,Rodriguez ML,Sirera P,Aupí M,Pérez S,Asensi M,Ortega A,Estrela JM.Topical treatment with pterostilbene,a natural phytoalexin,effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis.Free Radic Biol Med.2015 Aug;85:1-11.
- [0282] Song Y,Sun H,Xiao J,Wang F,Ding Y,Zhao J,Bai J,Cheng L,Gao K,Liu M,Guo Q,Zhang Y,Gao W,Jia Y,Wen A.Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of

epigallocatechin-3-gallate, silibinin, and curcumin in plasma and different tissues after oral dosing of Protandimin rats and its application in pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2019 Jun 5; 170:54-62.

[0283] Schuster S, et al. Resveratrol differentially regulates NAMPT and SIRT1 in Hepatocarcinoma cells and 833 primary human hepatocytes. *PLoS One.* 2014; 9: e91045

[0284] Thornton, A.M. (2003) Fractionation of T and B cells using magnetic beads. *Curr. Protoc. Immunol.* CHAPTER 3, Unit 3.5A.

[0285] Wani TA, Shah AG, Wani SM, Wani IA, Masoodi FA, Nissar N, Shagoo MA. Suitability of Different Food Grade Materials for the Encapsulation of Some Functional Foods Well Reported for Their Advantages and Susceptibility. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Nov 17; 56(15):2431-2454

[0286] Williams JP, Brown SL, Georges GE, Hauer-Jensen M, Hill RP, Huser AK, Kirsch DG, Macvittie TJ, Mason KA, Medhora MM, Moulder JE, Okunieff P, Otterson MF, Robbins ME, Smathers JB, McBride WH. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res.* 2010 Apr; 173(4):557-78.

[0287] Yoshino J, Imai S-I. Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide

[0288] (NAD⁺) with high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 2013; 1077:203-215.

[0289] 实施例2: PT和辐射防护作用

[0290] 首先, 研究了 γ 辐射的影响和小鼠存活率。研究了接受全身 γ 辐射的小鼠 (图1A)。小鼠接受全身 γ 辐射 (一次单剂量; ^{137}Cs , 0.5至0.6Gy/min; Biobeam 8000, GSM GmbH)。1Gy = 每千克物质吸收1J的能量。LD50/30约为7.2Gy (每辐射剂量, n=20)。

[0291] 接下来, 分析了接受 γ 射线 (LD50/30) 和紫檀芪 (PT) 处理的小鼠的三十天存活率 (图1B)。为此, 瑞士白化小鼠 (Charles River, n=20/组) 用氨磷汀 (2- (3-氨基丙氨基) 乙基硫烷基磷酸) (溶解在生理盐水中; 辐照前30分钟一次单口服剂量; 将对人推荐的200mg/m² 根据FDA的指导方针适应用于小鼠) 或紫檀芪 (溶解在2-羟丙基- β -环糊精中, 然后悬浮在0.3%羧甲基纤维素中; 口服施用, 每天一次, 辐照前5天和辐照后2天)。小鼠接受全身 γ 辐射 (一次单剂量, 7.2Gy的 ^{137}Cs , 0.5至0.6Gy/min, 设备=Biobeam 8000, GSM GmbH)。1Gy = 每千克物质吸收1J的能量。使用LogRank (Mantel-Cox) 检验分析数据 (*比较所有组与用溶媒处理的对照)。图1B中的结果表明, 100mg紫檀藤/kg的剂量对提高存活率 (60天) 发挥了最佳效果。

[0292] 还分析了用 γ 射线 (LD50/30) 和白藜芦醇 (Resv) 处理的小鼠的存活率, 结果如图1C所示。瑞士白化小鼠 (n=20/组) 用白藜芦醇 (溶解在2-羟丙基- β -环糊精中, 然后悬浮在0.3%羧甲基纤维素中; 口服施用, 每天一次, 辐照前5天和辐照后2天) 处理。小鼠接受全身 γ 辐射 (一次单剂量, 7.2Gy的 ^{137}Cs , 0.5至0.6Gy/min, Mortazavi SMJ et al. Dose-Response 11:281-292, 2013; 设备=Biobeam 8000, GSM GmbH)。1Gy = 每千克物质吸收1J的

能量。结果表明,白藜芦醇的辐射防护作用低于紫檀芪。

[0293] 研究了向小鼠口服给药后紫檀芪的血浆和血管外水平。用200mg紫檀芪(Pter)/kg体重处理小鼠。每个时间点处死一组4至5只动物。将Pter溶解在2-羟丙基- β -环糊精中,然后悬浮在0.3%羧甲基纤维素中。不可检测=n.d.* $P<0.1$,将10至1440分钟获得的数据与5分钟获得的数据进行比较。结果如下表1所示:

时间(min)	Pter (μ M)				
	血浆	脑	肺	肝脏	肾脏
5	5 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0.5
10	18 $\pm$ 4*	6 $\pm$ 2*	15 $\pm$ 6	8 $\pm$ 3*	4 $\pm$ 2*
30	55 $\pm$ 9*	10 $\pm$ 3*	23 $\pm$ 5*	11 $\pm$ 3*	6 $\pm$ 3*
60	98 $\pm$ 17*	24 $\pm$ 7*	35 $\pm$ 8*	17 $\pm$ 5*	10 $\pm$ 4*
120	46 $\pm$ 12*	14 $\pm$ 4*	21 $\pm$ 4*	12 $\pm$ 4*	8 $\pm$ 2*
240	21 $\pm$ 6*	8 $\pm$ 3*	12 $\pm$ 3*	7 $\pm$ 2*	2 $\pm$ 0.5
480	14 $\pm$ 5*	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0.5	n.d.
720	1 $\pm$ 0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1440	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[0295] 这些结果表明,在所有研究的组织中,紫檀芪水平在施用后60分钟达到峰值。

[0296] 总而言之,上述结果证实了PTER作为辐射防护剂的潜力。

[0297] 实施例3:PT+SIL的组合

[0298] 为了阐明紫檀芪是否可以与其他多酚结合以达到更好的辐射防护效果,瑞士白化小鼠(n=20/组)接受紫檀芪和/或其他多酚处理。对于口服施用,将PT溶解在2-羟丙基- β -环糊精中,然后悬浮在0.3%羧甲基纤维素中。检测的所有其他多酚植物化学物质代表主要的类黄酮和非类黄酮,即没食子酸(一种酚酸)、咖啡酸(一种羟基肉桂酸)、姜黄素(一种姜黄素类化合物)、表没食子儿茶素没食子酸酯(一种黄烷醇)、染料木素(一种异黄酮)、槲皮素(一种黄酮醇)、木犀草素(一种黄酮)、柚皮素(一种黄烷酮)、飞燕草素(一种花青素)和根皮苷(一种查耳酮),在口服施用前如PT那样进行溶解。每种植物化学物质的剂量选自己公布的最大无毒剂量。使用LogRank (Mantel-Cox) 检验分析数据(*比较所有组与用溶媒处理的对照,+比较所有组与仅用PT处理的组)(图2)。

[0299] 结果表明,PT与不同多酚的组合会产生不同的效果:

[0300] a) 在某些情况下,组合得到的存活率低于单独施用PT所提供的存活率。例如,这可以在辐照后60天将PT与没食子酸组合使用时看出。

[0301] b) 在某些情况下,两种化合物的组合得到的存活率与单独施用PT所提供的存活率相似,表明添加另一种化合物几乎不影响总体存活率。例如,这可以在辐照后60天将PT与飞燕草素组合使用时看出。

[0302] c) 在某些其他情况下,所得到的存活率大约等于单独施用的两种化合物所产生的存活率之和。例如,这可以在辐照后60天将PT与染料木素组合使用时看出。

[0303] d) 最后,也是最重要的,两种化合物的组合所得到的存活率导致了协同效应,其产生了异常增加的存活率,而这种效应不能从单独施用的两种化合物的效应总和中得出。最后一种情况仅发生在水飞蓟宾(SIL)和PT组合的情况下,并且均发生在辐照后30天和60天。

[0304] 总而言之,这些结果表明,SIL+PT的组合发挥了协同辐射防护作用,在 γ 辐射后30和60天实现了高存活百分比。

[0305] 鉴于该结果,研究了更长的时间下提高的存活率和增强的辐射防护。瑞士白化小鼠($n=20$ /组)接受PT(100mg/kg)和SIL(70mg/kg)腹膜内处理7天(γ 辐照前5天和 γ 辐照后2天)。对于腹膜内施用,将PT盐(紫檀芪磷酸二钠盐,SYNCOM,荷兰格罗宁根)和SIL盐(水飞蓟宾-C-2',3-二氢琥珀酸二钠盐,Rottapharm/Madaus,德国科隆)溶解于无菌疫苗级水。图3A显示了Kaplan-Meier曲线和LogRank(Mantel-Cox)检验(*比较PT+SIL处理组与用溶媒处理的对照)选择腹膜内施用是为了便于对大量小鼠进行常规给药。如图3A所示,PT+SIL组合提供了长期保护,辐照后1年后存活率约为25%(5/20)。这些结果证实了这两种化合物组合给药时的协同增强作用,并证明它们的组合辐射防护作用可以长时间持续。

[0306] 此外,图3B显示了 γ 辐照前后施用PT+SIL之间的比较:用PT(100mg/kg)和SIL(70mg/kg)腹膜内处理瑞士白化小鼠($n=20$ /组)7天(LD50/30 γ 辐照前5天和 γ 辐照后2天,浅灰色条;或 γ 辐照后7天,深灰色条)。使用LogRank(Mantel-Cox)检验分析数据(*比较辐照后处理组与辐照前处理组)。这些结果表明,如果在辐射之前施用多酚,则存活率会更高。

[0307] 接下来,紫檀芪(PT)和水飞蓟宾(SIL)对经 γ 辐照(LD50/30)小鼠的存活率的影响以及对体重的影响:瑞士白化小鼠($n=20$ /组)接受PT(100mg/kg)和SIL(70mg/kg)腹膜内处理7天(γ 辐照前5天和 γ 辐照后2天)。使用学生t检验进行统计学分析(* $P<0.01$,比较PT+SIL与用溶媒处理的对照)。结果如图4A所示,可以看出多酚减少了辐射诱发的体重减轻。

[0308] 紫檀芪(PT)和水飞蓟宾(SIL)组合施用对小鼠全身辐射诱发的神经运动功能改变的影响:瑞士白化小鼠($n=20$ /组)接受PT(100mg/kg)和SIL(70mg/kg)腹膜内处理7天(γ 辐照前5天和 γ 辐照后2天)。为了研究神经运动功能,标准化旋转棒测试进行如下:测试功能包括评估对象的平衡力、抓握力和运动协调性;尤其是在测试实验药物的效果方面。对于此测试(旋转棒,HarvardApparatus,马萨诸塞州霍利斯顿),每只动物进行了3次试验,测量了其在旋转轴(直径3.5cm;旋转速度:15rpm)上保持不跌落的最长持续时间(秒)。每只小鼠在1200秒的任意极限内最多可以尝试3次,并记录最长的时间。每周监测不同组随时间的变化。如图4B所示,结果表明,神经运动功能并未因辐射和/或PT和SIL的施用而显著改变。

[0309] 接下来,通过RT-PCR研究了分离的细胞中不同抗氧化防御相关酶活性的表达分析。使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较PT+SIL+ γ 射线处理的小鼠与仅 γ 射线处理的小鼠;+比较PT+SIL处理的小鼠与用溶媒处理的对照)。这些结果如图5所示,得出的结论是辐射降低了所有研究的抗氧化防御相关分子的表达,而PT和SIL抵消了辐射诱发的影响。

[0310] 此外,通过评估不同的分子标志物,研究了PT和SIL对 γ 辐射诱发的氧化损伤的保护作用。为此,按照先前指定的剂量施用PT、SIL和 γ 射线(每种分子、细胞类型和处理, $n=5$),并使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较所有组与对照;+比较PT+SIL+ γ 射线处理的小鼠与仅 γ 射线处理的小鼠)。如图6所示,PT和SIL抵消了辐射诱发的不同氧化应激相关生物标志物的增加。

[0311] 为了对PT和SIL组合施用时的辐射防护作用进行完整分析,还测量了GCL和GSH介导的抗氧化防御。由此,按照先前指定的剂量施用PT、SIL和 γ 射线(每种分子、细胞类型和处理, $n=5$),并使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较所有组与对照; +比较PT+SIL+ γ 射线处理的小鼠与仅 γ 射线处理的小鼠)。如图7所示,PT和SIL抵消了辐射诱发的不同谷胱甘肽相关生物标志物的减少。

[0312] 在图8中,当按照先前指定的剂量(每种分子、细胞类型和处理, $n=5$)施用PT、SIL和 γ 射线时,测量过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶(图8A和图8B)以及超氧化物歧化酶水平(图8C和图8D)。使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较所有组与对照; +比较PT+SIL+ γ 射线处理的小鼠与仅 γ 射线处理的小鼠)。结果表明,PT和SIL抵消了辐射诱发的不同抗氧化酶活性的降低。

[0313] 最后,研究了PT和SIL对 γ 辐射诱发的循环CD2+淋巴细胞的染色体畸变和微核形成的影响。使用Q-FISH技术对早熟染色体凝集融合体的端粒和着丝粒进行染色。使用端粒和着丝粒染色,对双着丝粒、着丝粒环、以及来自无端粒染色的中间缺失的无着丝粒染色体、仅具有1个端粒的无着丝粒染色体(代表末端缺失)、和具有2个端粒的无着丝粒染色体(源自2个无着丝粒染色体的融合体,伴随着双着丝粒或无着丝粒环的形成)进行评分,计算产生的双链DNA断裂(DSB)。在骨髓中,使用MayGrunwald和Giemsa染色剂进行双重染色。根据该方法,多染性红细胞(PCE)染成红蓝色,正染性红细胞(NCE)染成橙色,而细胞核物质呈深紫色。对微核的多染(MnPCE)细胞和微核的正染(MnNCE)细胞计数。使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较所有组与对照; +比较PT+SIL+ γ 射线处理的小鼠与仅 γ 射线处理的小鼠)。结果如下表2所示:

	染色体改变					微核	
	双着丝粒数目/ 10 ³ 个细胞	环数目/ 10 ³ 个细胞	过多无着丝粒的数 目/10 ³ 个细胞	双着丝粒+环/ 细胞	DSB/ 10 ³ 个细胞	MnPCE/ 10 ³ PCE	MnNCE/ 10 ³ PCE
[0314] 对照 (未处理)	8.9±1.1	0±0	9.7±1.1	0.0089±0.0011	0±0	4.9±0.7	5.3±0.8
γ 辐照 +溶媒	3317±175*	597±51*	2692±117*	3.9±0.2*	797±53*	209±25*	24±4*
γ 辐照 +PT+SIL	1063±130*+	118±23*+	608±58*+	1.2±0.1*+	133±19*+	33±9*+	6±1+

[0315] 从表2中可以看出,PT和SIL减少了所有辐射诱发的细胞遗传学改变,即染色体改变和微核的形成。

[0316] 实施例4:PT和SIL与辐射缓和剂的组合

[0317] 接下来探究了辐射防护剂(可以减少辐射造成的直接损伤的分子)和辐射缓和剂(即使在已释放辐射后也能够将毒性降至最低的化合物)的组合是否有利于延长生存期。为了研究这一点,将PT和SIL与NAD⁺加强剂烟酰胺核苷(NR)以及与To11样受体2/6激动剂FSL-1脂肽(FSL-1)组合。

[0318] 首先,研究了两种分子单独以及组合的效果以确认它们的辐射缓和特性。为此,将NR(烟酰胺核苷,3-氨基羰基-1- β -D-呋喃核糖基-吡啶鎓,Elysium Health, Inc.,纽约州纽约)溶解在疫苗级水中,在口服前使溶液的pH值中和(pH7.0)(185mg/kg $\times$ 天)。将FSL-1(成纤维细胞刺激性脂肽1,InvivoGen,加利福尼亚州圣地亚哥)重悬于无菌疫苗级水中,并腹腔内施用(0.25mg/kg $\times$ 天,施用体积为50至60mL,取决于小鼠的体重)。NR每天施用,持续30

天,每天一次单剂量,并在辐照后立即开始。FSL-1仅在辐照后24小时施用一次。使用的小鼠总数为20只。结果如图9所示,其中观察到,单独施用这些分子中的每一种所提供的 γ 辐照后60天的存活率对于NR为0%,对于FSL-1为5%,对于NR+FSL1的组合为10%。

[0319] 接下来,瑞士白化小鼠($n=6$ /组)按照先前计划并按上述剂量用PT、SIL或NR处理,并使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较120分钟与30分钟; +比较2天与天; #比较3天或15天与0天),结果如图10所示。从图中可以看出,在其施用后30分钟PT和SIL水平较高, NR诱发的NAD⁺水平发现在测量的两个时间点(30分钟和120分钟)相似。

[0320] 接下来,将四种化合物PT、SIL、NR和FSL-1按上述剂量施用到 $n=20$ 只小鼠/组中。图11A显示了遵循的施用时间表。图11B显示了Kaplan-Meier曲线和LogRank (Mantel-Cox) 检验(*比较所有组与用溶媒处理的对照组; +比较PT+SIL+NR+FSL1处理组与PT+SIL+NR-或PT+SIL+FSL1处理组)。令人惊讶的是,当NR和FSL1与PT和SIL组合使用时,还发现了协同效应,因为小鼠的存活率增加至长达一年。重要的是,四种成分的组合为高达90%的经处理的小鼠提供了防护和存活,这表明四种成分的组合实现了辐照的小鼠的长期存活。

[0321] 研究了 γ 辐照小鼠(LD50/30)的死亡原因以及四种化合物组合施用的效果,如图12所示。瑞士白化小鼠($n=20$ /组)按照先前计划并按上述剂量用PT、SIL、NR和FSL-1处理,结果显示完整组合(PT+SIL+NR+FSL-1)确实避免了与a)胃肠道和造血ARS以及b)肾病相关的所有死亡。完整组合还使与髓性白血病和感染/炎症相关的死亡降至最低。

[0322] 接下来,研究了 γ 辐射诱导的毒性以及PT、SIL、NR和FSL-1(简称PSNF)组合引起的预防。结果如下表3所示:

	对照	γ 辐照+溶媒	γ 辐照+ PSNF
血液学			
红细胞比容(%)	39.8 ± 1.3	25.9 ± 1.0*	33.1 ± 2.3*+
血红蛋白(g/dL)	12.4 ± 0.4	8.1 ± 0.3*	10.1 ± 0.6*+
红细胞($10^6/\mu\text{L}$)	8.78 ± 0.19	6.0 ± 0.3*	7.68 ± 0.15*+
血小板($10^3/\mu\text{L}$)	452 ± 27	135.8 ± 20.7*	241 ± 21*+
白细胞($10^3/\mu\text{L}$)	2.7 ± 0.2	0.84 ± 0.11*	1.74 ± 0.11*+
淋巴细胞($10^3/\mu\text{L}$)	1.42 ± 0.15	0.42 ± 0.08*	0.96 ± 0.11*+
中性粒细胞($10^3/\mu\text{L}$)	1.06 ± 0.05	0.34 ± 0.05*	0.56 ± 0.09*+
单核细胞($10^3/\mu\text{L}$)	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.03*	0.07 ± 0.03+
嗜酸性粒细胞($10^3/\mu\text{L}$)	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.09 ± 0.02
嗜碱性粒细胞($10^3/\mu\text{L}$)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
骨髓细胞计数(10^6 个细胞/股骨)	18.8 ± 1.0	7.4 ± 0.8*	10.7 ± 0.9*+
血浆渗透压(mOsm/kg)	270 ± 13	240 ± 11*	265 ± 18+
临床化学			
尿素(mg/dL)	47.4 ± 1.3	56.5 ± 1.0*	47 ± 3+
尿酸(mg/dL)	1.78 ± 0.08	1.28 ± 0.13*	1.58 ± 0.08+
总蛋白(g/dL)	3.96 ± 0.11	3.20 ± 0.16*	3.54 ± 0.05*+
白蛋白(g/dL)	3.06 ± 0.11	2.74 ± 0.09*	3.06 ± 0.05
肌酐(mg/dL)	0.40 ± 0.07	0.48 ± 0.04	0.40 ± 0.07+
葡萄糖(mg/dL)	135 ± 3	122 ± 4*	131.4 ± 1.3+
总胆红素(mg/dL)	0.52 ± 0.04	0.38 ± 0.04*	0.48 ± 0.04+
直接胆红素(mg/dL)	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03
天冬氨酸转氨酶(IU/L)	145 ± 10	264 ± 9*	197 ± 16*+
丙氨酸转氨酶(IU/L)	7.1 ± 0.3	50 ± 4*	28 ± 4*+
γ -谷氨酰转肽酶(IU/L)	1.82 ± 0.13	3.5 ± 0.3*	2.12 ± 0.19+
碱性磷酸酶(IU/L)	122 ± 7	163 ± 8*	136 ± 12+
乳酸脱氢酶(IU/L)	197 ± 10	363 ± 14*	246 ± 10*+
钠(mEq/L)	143 ± 6	119 ± 5*	138 ± 5+
钾(mEq/L)	8.04 ± 0.11	10.6 ± 0.4*	8.7 ± 0.4+
氯化物(mEq/L)	95 ± 4	114 ± 5*	100 ± 2+
分离的 CD2⁺淋巴细胞			
GSH(nmol/ 10^6 个细胞)	5.5 ± 0.2	3.02 ± 0.19*	4.40 ± 0.16*+
细胞体积(μm^3)	176 ± 5	196 ± 6*	182 ± 4+
葡萄糖利用($\mu\text{mol/g} \times \text{min}$)	1.10 ± 0.07	0.60 ± 0.10*	1.00 ± 0.07+
谷氨酰胺利用($\mu\text{mol/g} \times \text{min}$)	3.32 ± 0.08	2.02 ± 0.13*	2.98 ± 0.08*+

[0325] 从表3中可以看出,用完整组合 (PT+SII+NR+FSL-1) 处理有助于改善辐射诱导的毒性。

[0326] 最后,为了阐明四种组合的化合物 (PT+SIL+NR+FSL-1; PSNF) 的处理是否会干扰肿瘤异种移植中抗癌放疗(X射线)的治疗效果,将雌性nu/nu裸鼠(6至8周龄)(n=5只小鼠/组)每只小鼠皮下接种 5×10^6 个A549(肺腺癌)或MDA-MB-231(三阴性乳腺癌)细胞。肿瘤体积基于使用卡尺测量的两个维度计算,并根据公式 $V=0.5a \times b^2$ 表示(单位立方毫米),其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。使用飞利浦的6keV SL75直线加速器用X射线(10Gy)对肿瘤进行辐照。单次放疗以5.0Gy/min的速率进行。PSNF施用的方案与上述相同,放疗在第21天进行。使用学生t检验进行统计学分析($P<0.01$; *比较所有组与对照组; +比较 γ 射线+PSNF处理组与仅 γ 射线处理的组)。

[0327] 结果如图13所示,可以看出四种化合物的组合并没有减弱X射线抗癌治疗的功效,证明了将这些化合物用于接受所述放疗治疗的患者可行性。

[0328] 总而言之,这些结果支持使用至少包含PT和SIL以及任选的NR和FSL1的组合物来防护和缓和由辐射诱发的损伤。值得注意的是,这些化合物的辐射防护作用延长了较长的时间(1年或更长时间),如图3A和图11B所示。

[0329] 实施例5:紫檀芪、水飞蓟宾和烟酰胺核苷减少细胞DNA损伤,FSL1脂肽促进造血系统的恢复

[0330] 如图14a所示,NR处理增加了不同细胞类型中NAD⁺的含量,并且还防止了 γ 辐射诱导的NAD⁺减少。仅施用PT+SIL不影响任何研究的细胞中的NAD⁺水平,也不会影响NR引起的增加(结果未显示)。施用FK866(一种烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)的特异性非竞争性抑制剂)降低了用PT+SIL+NR或PT+SIL+NR+ γ 射线处理的小鼠的NAD⁺水平(图14a)。FK866诱导的NAD⁺耗竭与NAMPT活性的急剧下降相关(图14b)(PT、SIL、NR、FSL1和/或 γ 辐射不影响FK866诱导的对NAMPT活性抑制的速率,未显示)。重要的是,如图14c所示,基于DNA损伤彗星测定,PT+SIL或NR有利于DNA恢复,并且它们的组合是最有效的(图14c)。据推测,多酚的作用是抗氧化相关的机制,而NR诱导的NAD⁺增加直接促进DNA修复活性。如图14d所示,FSL-1增加造血集落形成细胞CFU-GM(集落形成单位-粒细胞、巨噬细胞)和CFU-GEMM(集落形成单位-粒细胞、红细胞、巨噬细胞、巨核细胞)。从而证实了上表3中根据血液学的数据所表明的辐照后造血恢复。

[0331] 辐射防护机制中Nrf2、NF- κ B、PGC-1 α 和PARP1的相互作用

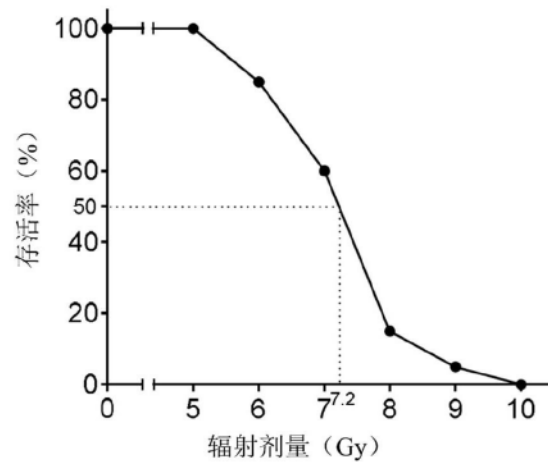
[0332] 使用分离的肠上皮细胞来研究PT+SIL组合引起的防护作用中可能涉及的潜在信号传导通路。基于图5至图8中报告的数据,PT+SIL对 γ 辐射诱发的氧化损伤发挥防护作用。据推测,观察到的防护作用是由于Nrf2(核因子红细胞2相关因子2)依赖性抗氧化防御的诱导(图5至图8)。据报道,两种多酚都具有抗炎特性,因此表明涉及NF- κ B(核因子活化B细胞 κ 轻链增强子)依赖性信号传导。NR诱导的NAD⁺增加也将有利于PARP1(多聚[ADP-核糖]聚合酶1)依赖性DNA修复、去乙酰化酶活性和PGC-1 α (过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α)激活。此外,PT可诱导PGC-1 α 、Nrf2激活和Sirt1表达;而SIL可影响Sirt3表达和PARP1活性。如图15a所示,与对照相比,PT和SIL均增加核Nrf2,同时降低核NF- κ B水平。在Nrf2的情况下,PT的作用比SIL的作用更显著。这些作用总体上表明在促进抗氧化防御同时下调NF- κ B依赖性促炎症反应方面具有协同作用。pPGC-1 α 也因PT而增加(图15a)。Sirt1水平因PT而增加。有趣的是,尽管单独的SIL不影响Sirt1水平,但是两种多酚的组合比单独的PT更能增加Sirt1水平(图15a)。PT和SIL均增加Sirt3水平,尽管SIL对Sirt3的影响更强劲(图15a)。PT和SIL均增加了PARP1(图15a)。图15b概述了这些信号传导级联之间可能的分子相互关系,以及PT和SIL可能发挥其作用的步骤。为了进一步研究哪些特定分子可能对辐射防护作用是决定性的,使用了分离的IEC(来自对照或PT+SIL处理的小鼠,如图11a所示)和基于基因沉默的方法。如图15c所示,靶向小鼠Nf κ bie、Nfe2l2、Ppargc1、Sirt1、Sirt3、Parp1、SOD2或GPX1基因表达的siRNA促进游离NF- κ B的增加和所有其他分子靶标的下调。将分离的IEC在不存在或存在确保体内诱导的辐射防护防御得以保留的浓度(参见图15的说明)的PT+SIL的情况下和存在特定siRNA的情况下培养24小时。如图15d所示,PT和SIL大大减少了在对照(溶媒处理的)细胞中观察到的 γ 辐照诱导的细胞死亡。基于特定RNA在经受 γ 射线细胞中作用的细胞死亡分析,表明Nrf2、pPGC-1 α 、SOD2和Sirt3主要负责(图15d)多酚处理引起的辐射防护作用。

[0333] 结论

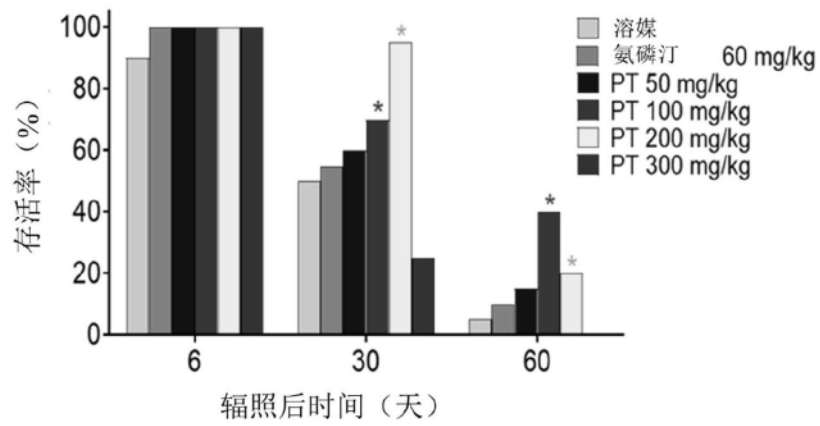
[0334] 在此,研究了全身性施用的PT针对 γ 辐射的影响,发现将PT和SIL组合可以提高存活率。此外,潜在的辐射防护剂和辐射缓和剂的联合作为减少辐射引起的损伤和提高存活率的策略仍然是尚未开发的领域。目前的工作显示了组合能够在经受致死的 (LD50/30) γ 辐射的小鼠中实现长期存活的效力。这种新颖的策略证明了延长的生存期,可以作为向前进步的范例。因此,考虑到大量分子作为辐射防护剂和/或辐射缓和剂被测试,这种范例可能有助于开拓该领域。PT和SIL上调不同细胞类型的抗氧化防御,并减少 γ 辐射诱导的氧化损伤和细胞遗传学改变 (染色体畸变和微核形成)。如图15所示,PT和SIL引起的防护可能涉及相互关联的不同信号传导机制。氧化应激和炎症是因细胞暴露于有害电离辐射而激活的直接病理生理机制。PT和SIL增加核Nrf2和不同细胞类型的抗氧化反应 (图15),而它们减少NF- κ B (图15),并且可能减少与辐射相关的炎症反应。此外,PT增加Sirt1水平,从而促进PGC-1 α 的脱乙酰化 (图15)。PGC-1 α 是Sirt3表达的诱导剂,如图15所示,SIL处理也与Sirt3水平的增加相关。线粒体SOD2 (被Sirt3脱乙酰化) 和GSH过氧化物酶 (取决于从细胞质中输入GSH) 将有助于减少线粒体衍生的ROS并防止细胞凋亡激活。重要的是,如图15c和15d所示,基于基因沉默的方法确定了连接Nrf2、Sirt3和SOD2的途径是PT和SIL组合处理引起的辐射防护作用的关键。此外,NR生成NAD⁺以支持Sirt1和Sirt3活性以及PARP1依赖性DNA修复 (图15)。PARP1活性也由两种多酚诱导 (图15)。NR是维生素B3的吡啶核苷形式,是NAD⁺的前体,相对于其他形式的B3 (烟酸和烟酰胺) 具有更优异的药代动力学特征,因此它代表了最佳的NAD⁺加强剂。

[0335] 这项工作表明,两种辐射防护剂紫檀芪和水飞蓟宾与两种辐射缓和剂烟酰胺核苷和成纤维细胞刺激性脂蛋白1一起,可以长期保护正常组织抵抗致命剂量的辐射。这四种分子的既定安全特征显然需要继续研究,以将这种组合应用于人类。理想的辐射防护剂或辐射缓和剂应该是稳定的,提供易于施用的可能性,没有相关的全身毒性,并保护正常组织免受辐射诱发的损伤。所提出的组合满足这些标准,同时表现出高功效。

A)



B)



C)

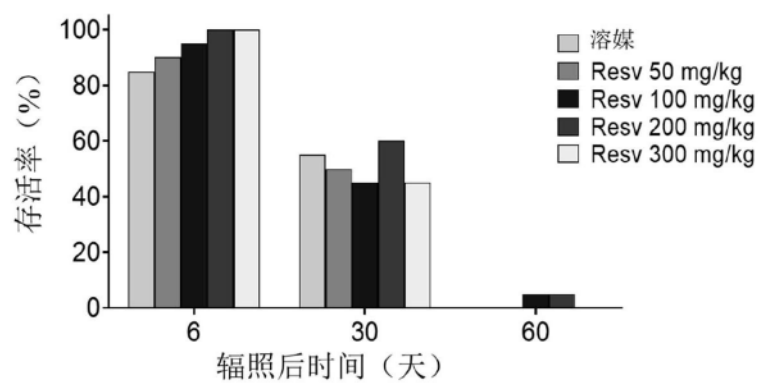


图1

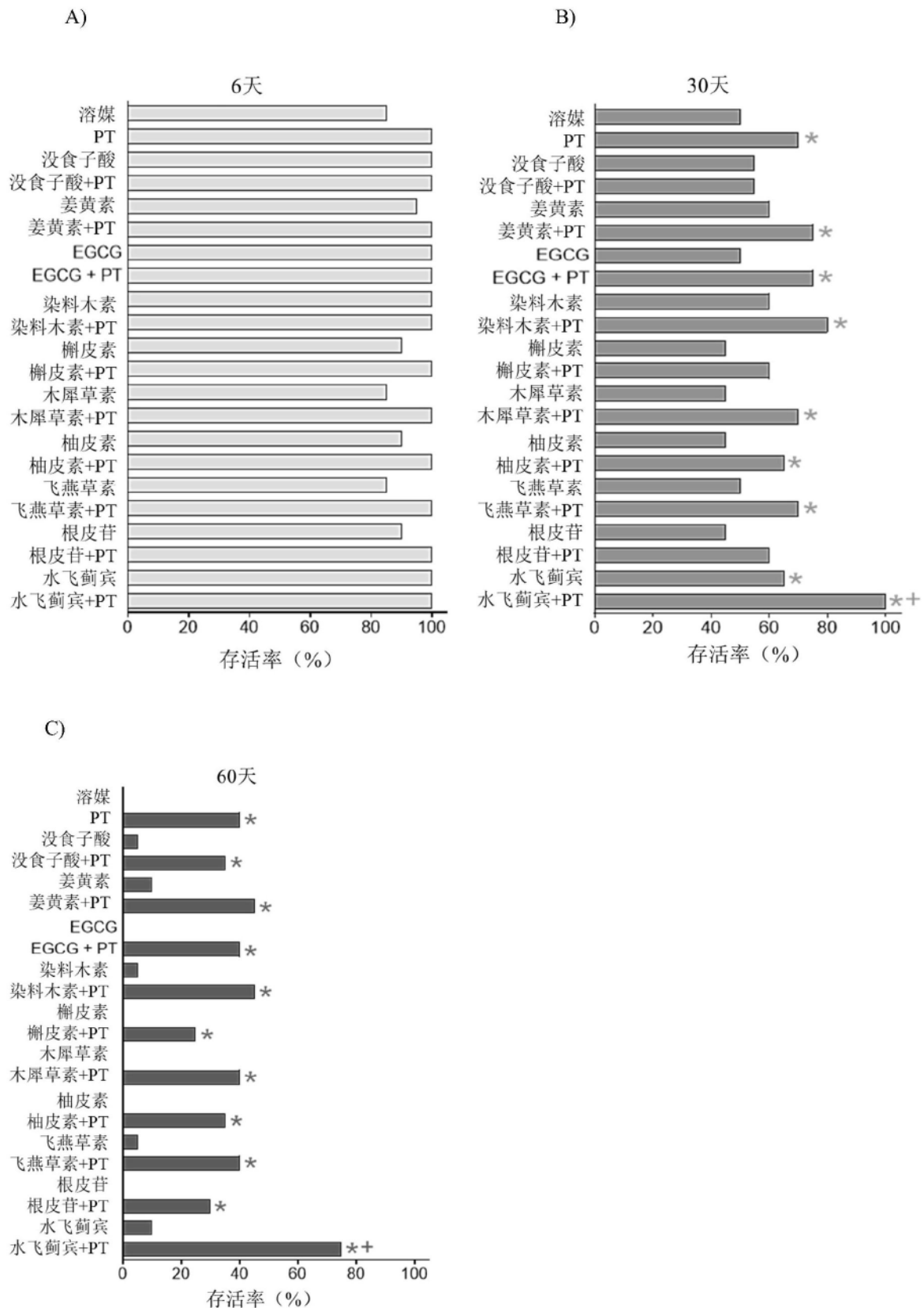
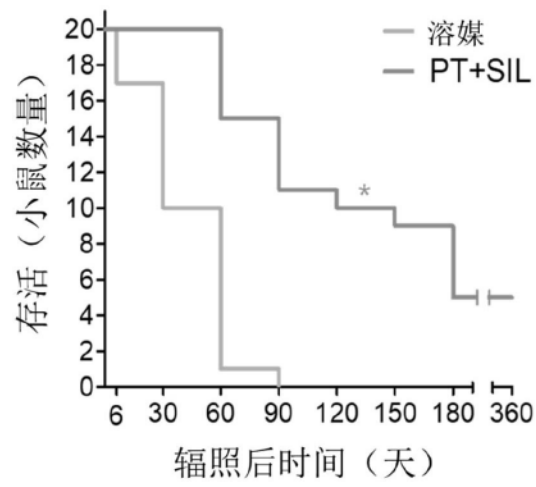


图2

A)



B)

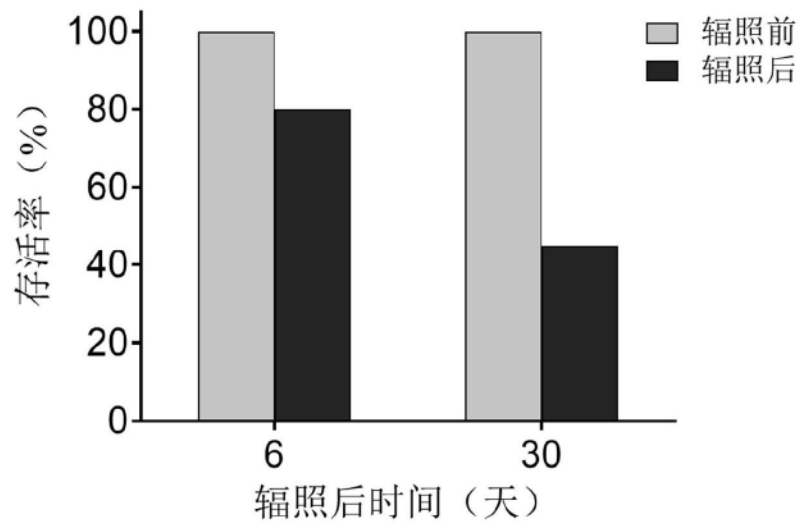


图3

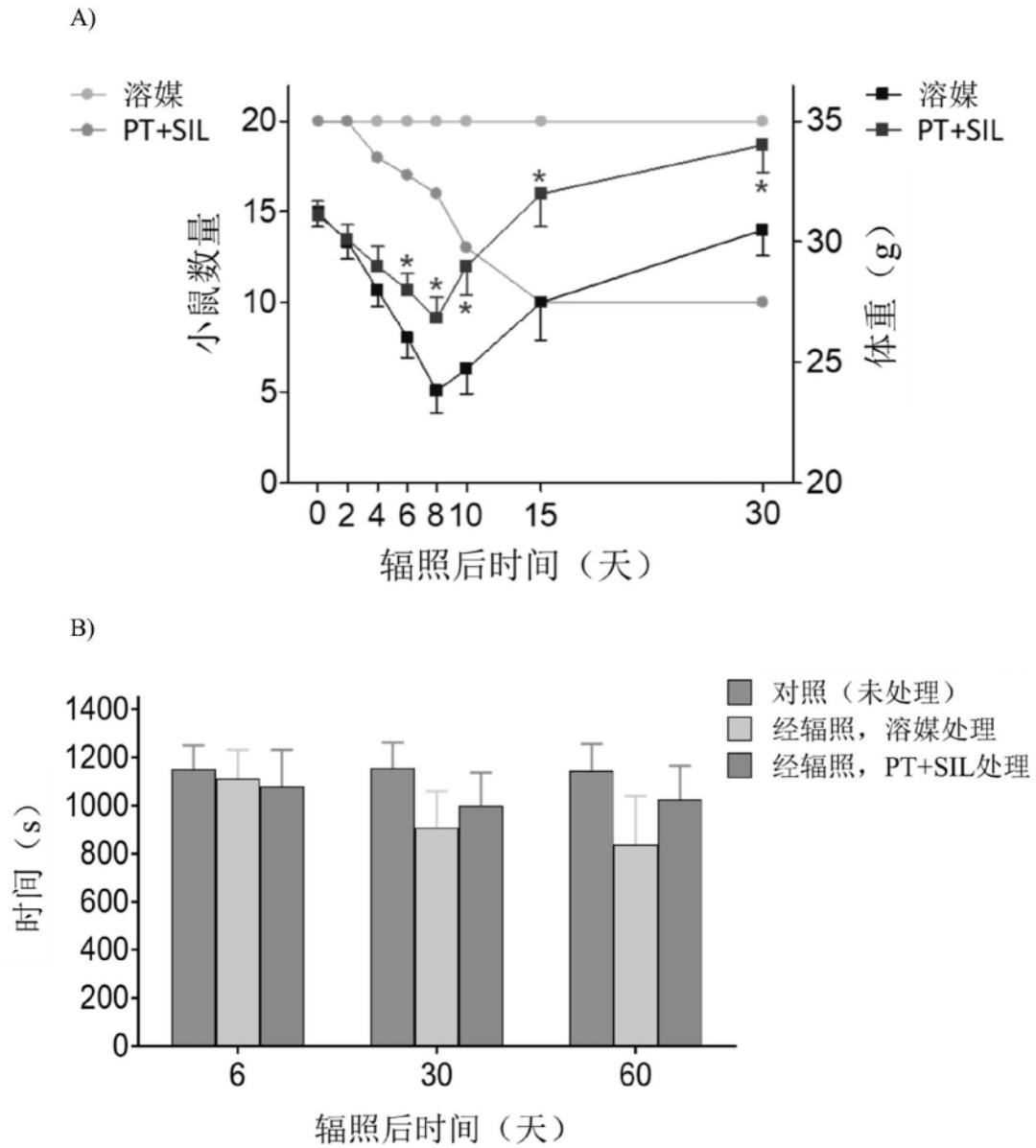


图4

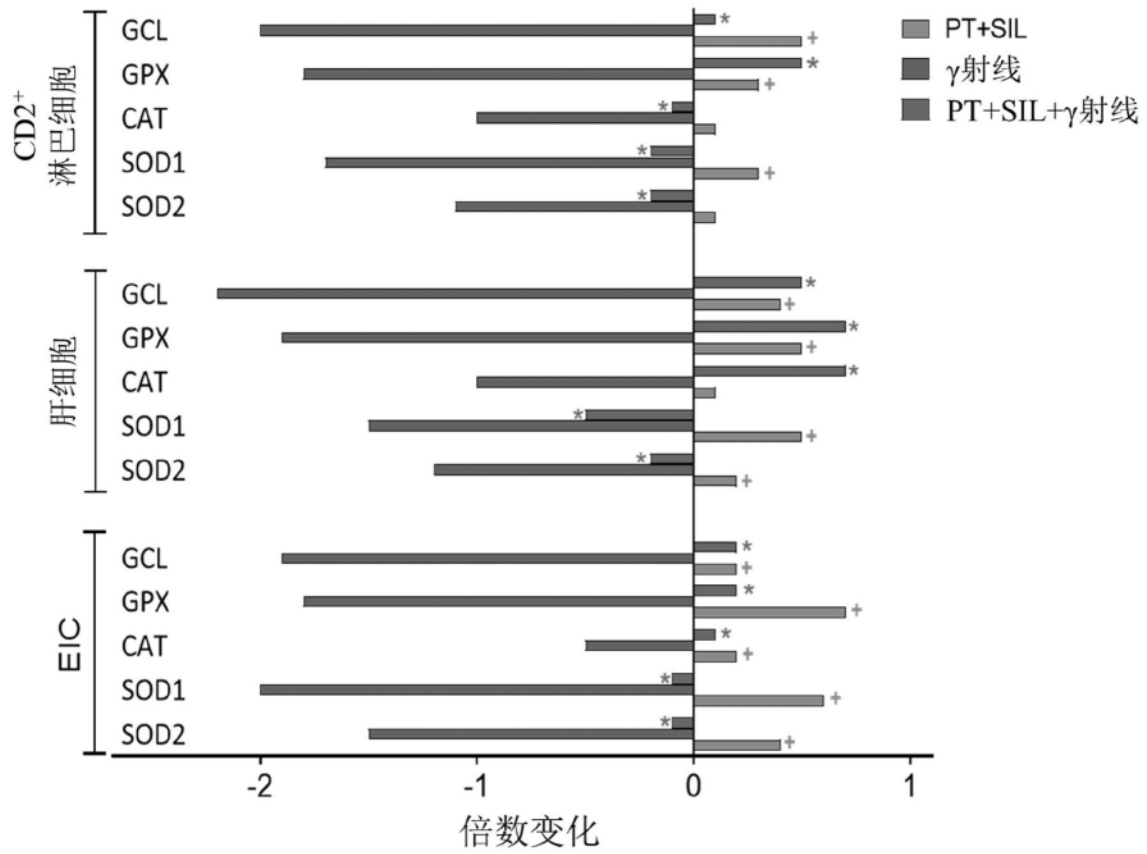


图5

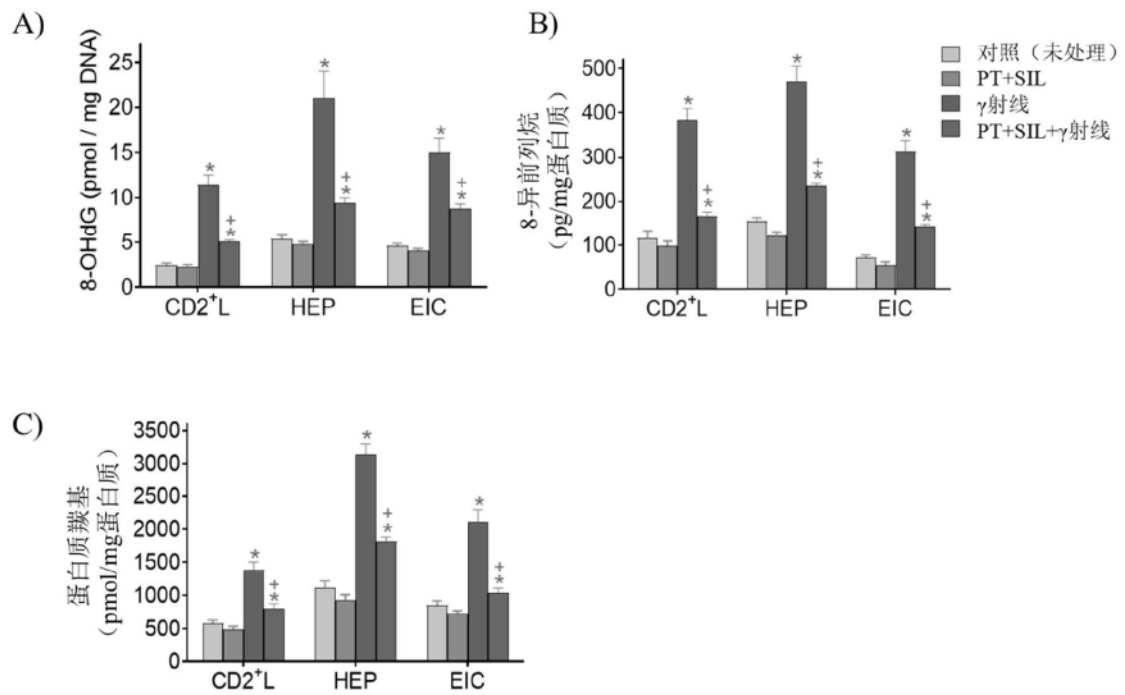


图6

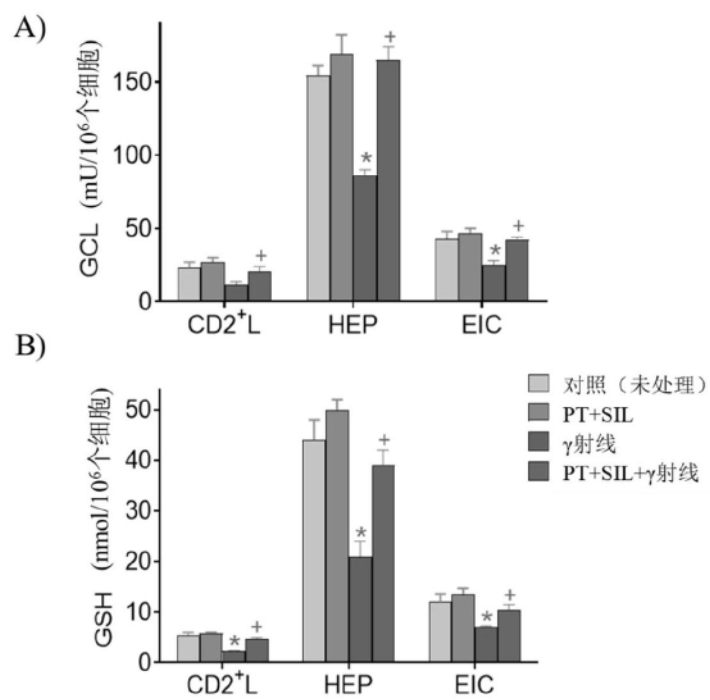


图7

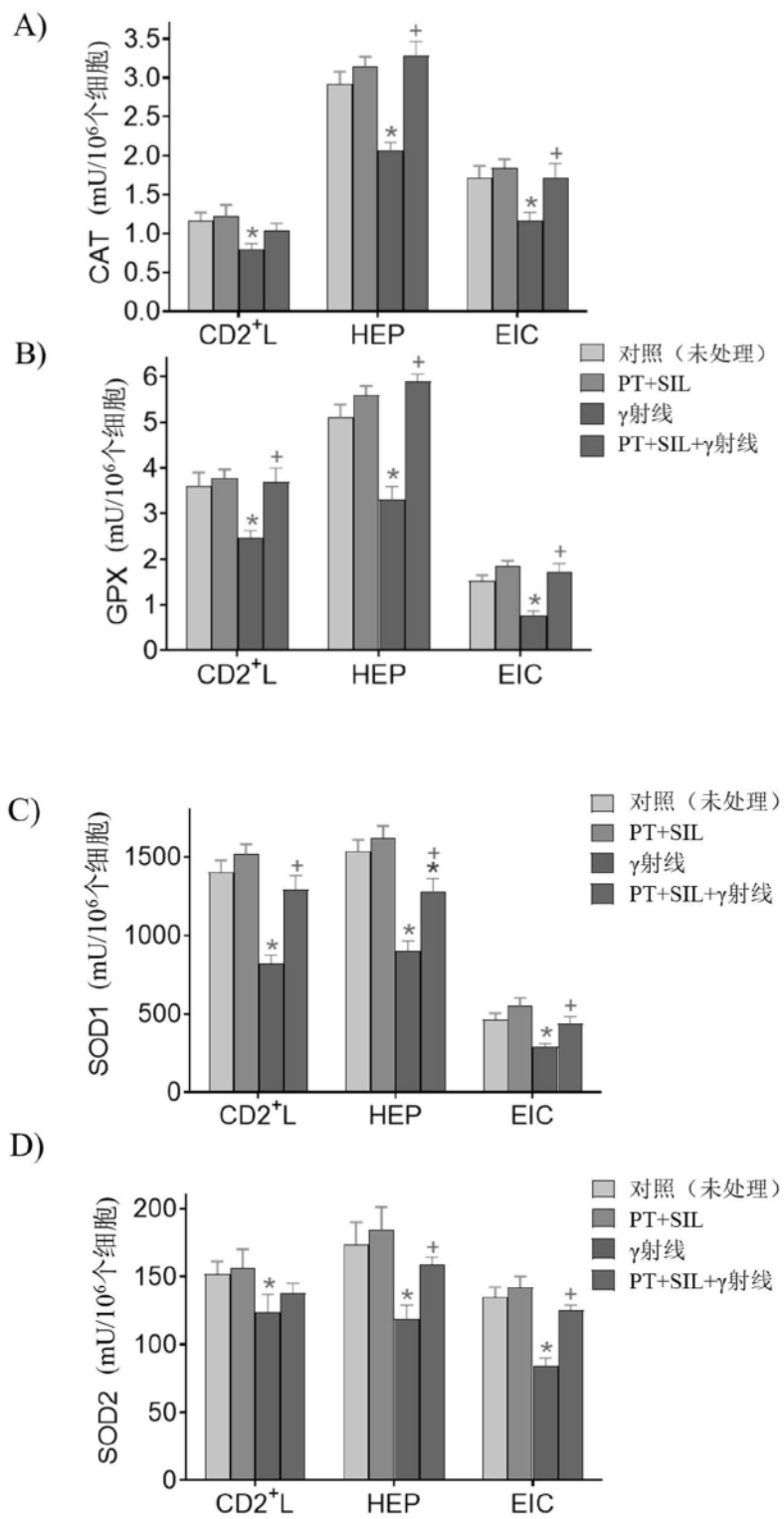


图8

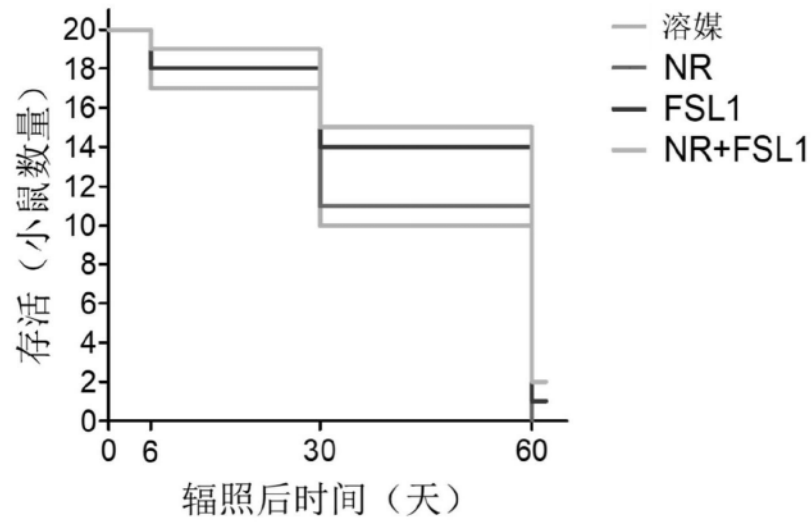


图9

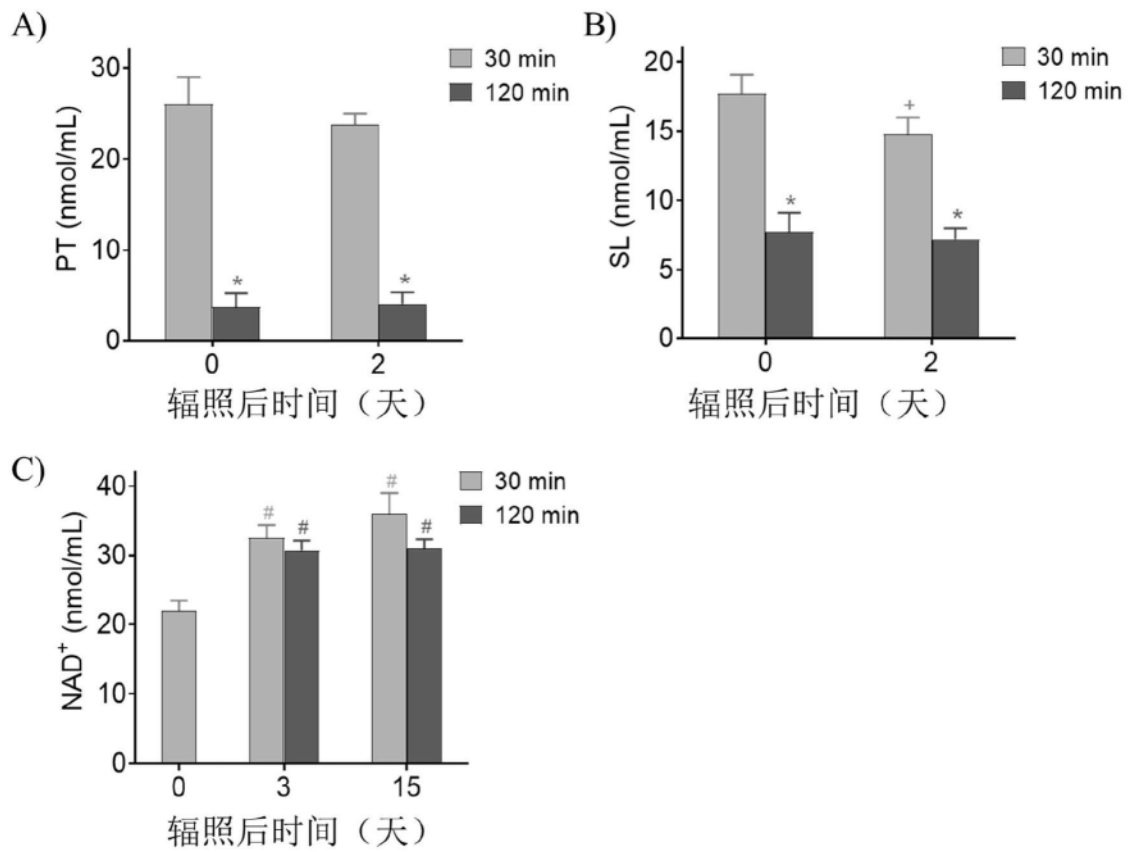


图10

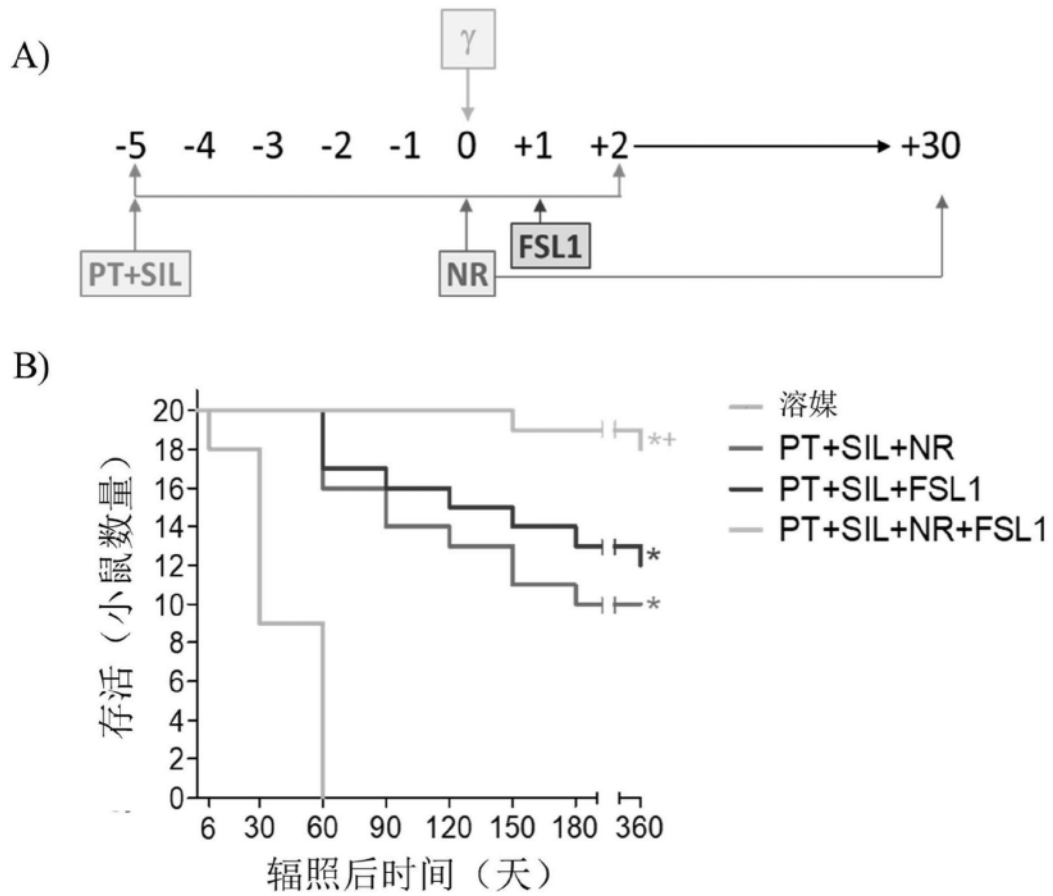


图11

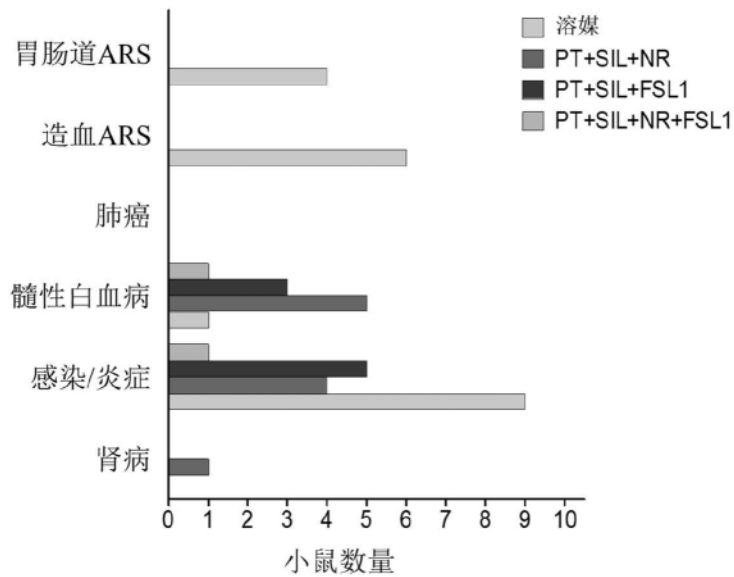


图12

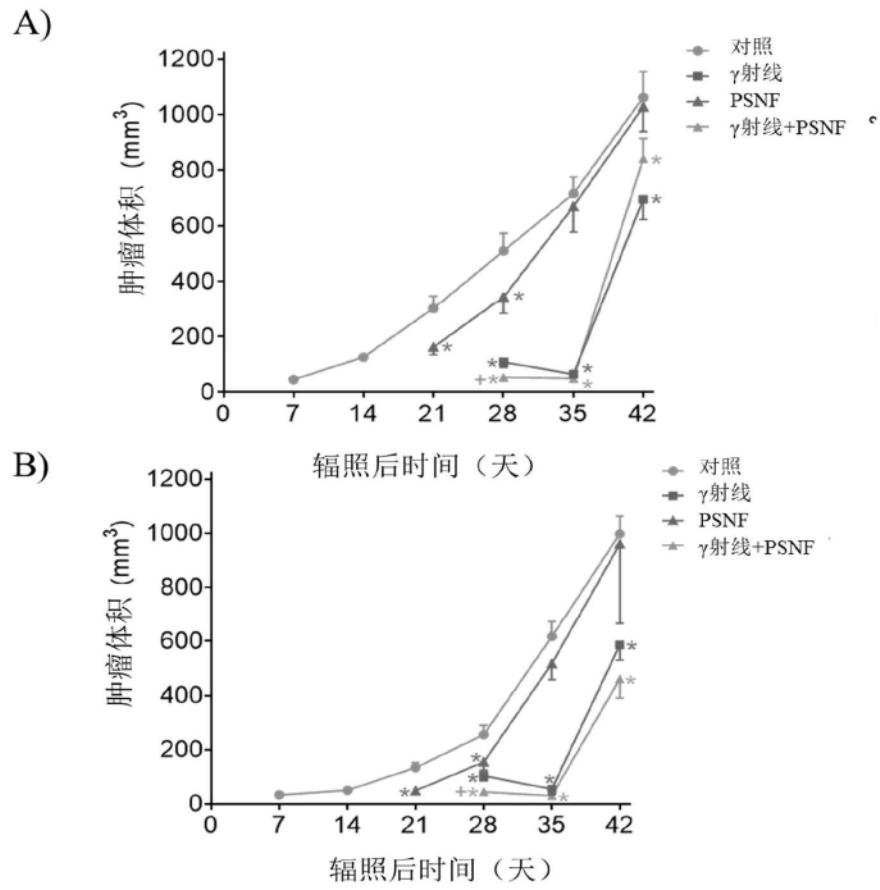


图13

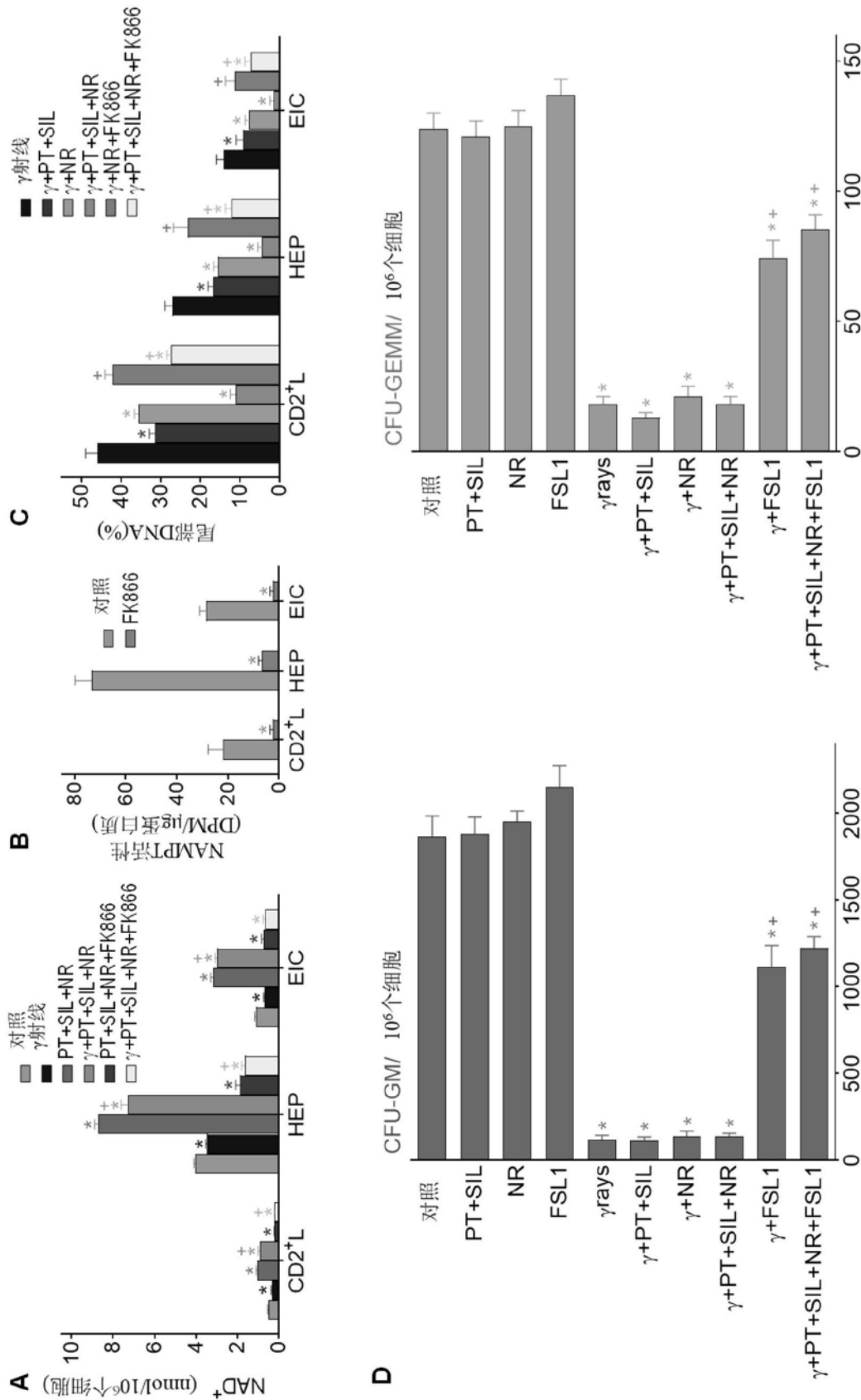


图14

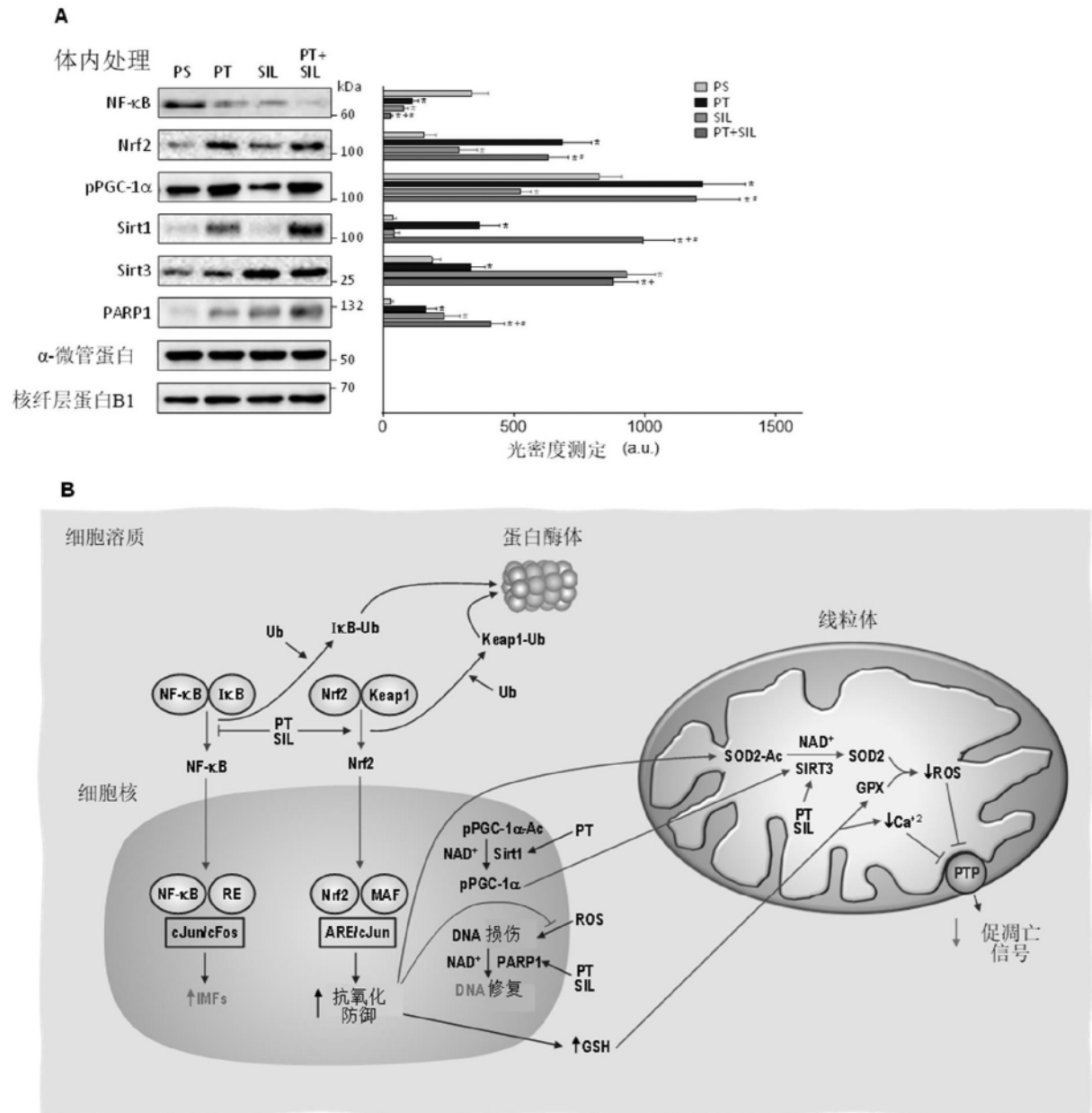


图15

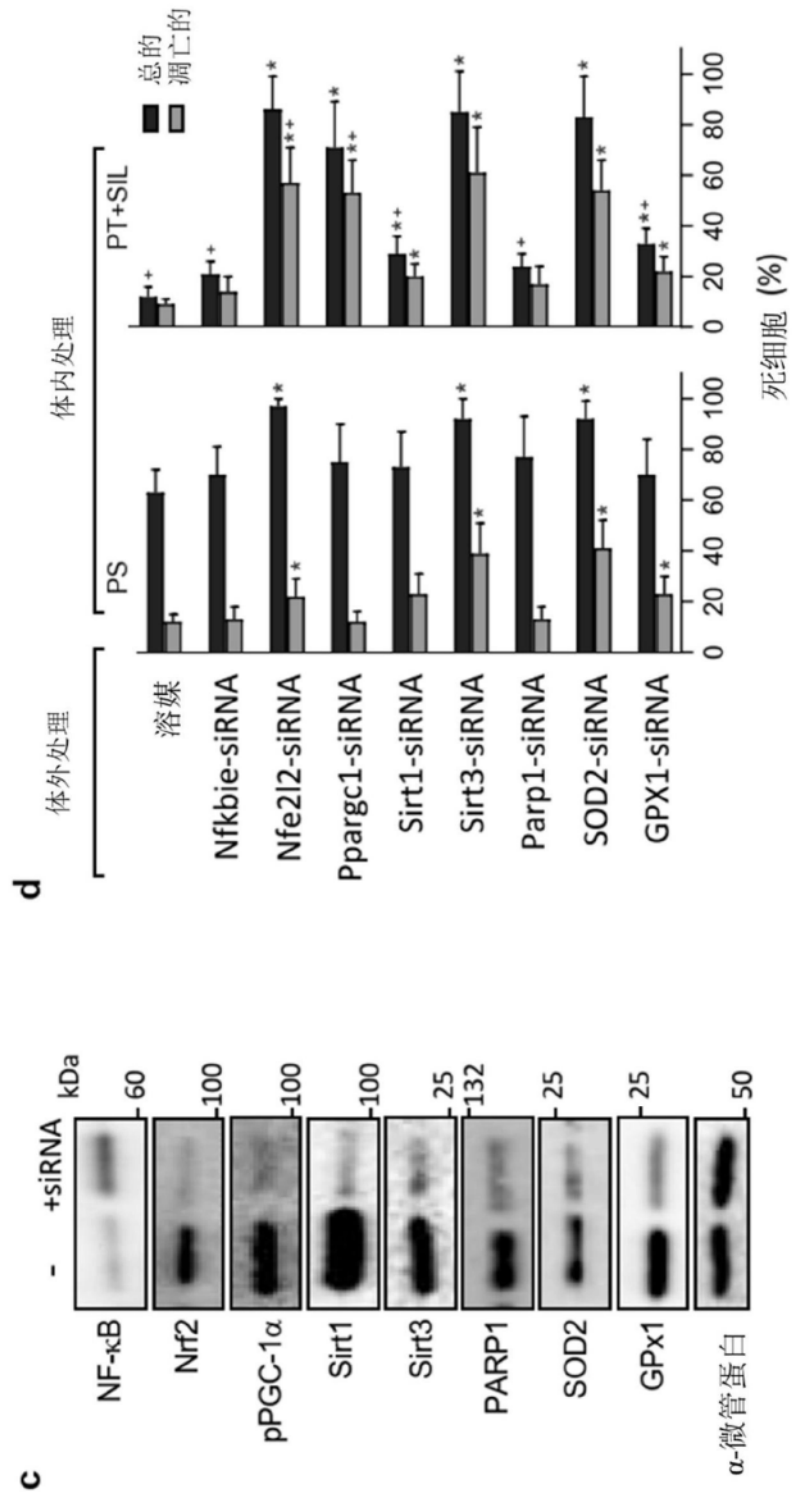


图15(续)