



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110859837 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201810980530.5

(22)申请日 2018.08.27

(71)申请人 澳门大学

地址 中国澳门凼仔大学大马路澳门大学

(72)发明人 王瑞兵 张相军 李升可

(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

代理人 魏彦

(51)Int.Cl.

A61K 31/4188(2006.01)

A61P 39/02(2006.01)

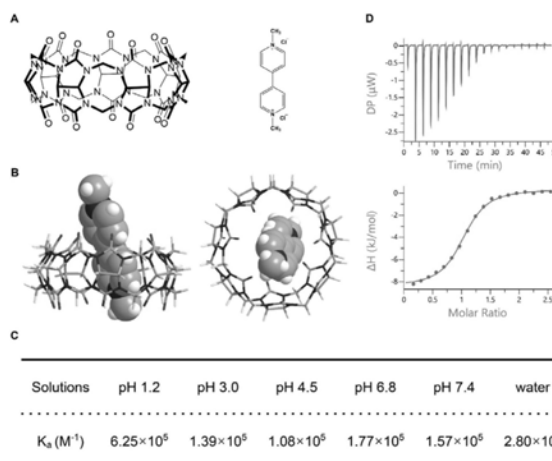
权利要求书1页 说明书14页 附图11页

(54)发明名称

瓜环[7]在百草枯解毒中的应用

(57)摘要

本发明公开了瓜环[7]在百草枯解毒中的应用,涉及百草枯解毒技术领域。本发明的研究结果显示瓜环[7]可以在胃肠道中与百草枯形成复合物,减少百草枯的肠道吸收,进而达到解毒效果,瓜环[7]可以用到制备百草枯中毒的特效口服解毒剂等领域中,用于百草枯解毒。



1. 瓜环[7]在制备用于治疗百草枯中毒的解毒剂中的应用。
2. 瓜环[7]在制备用于抑制由百草枯引起的细胞活性氧水平升高或细胞调亡的药物中的应用。
3. 瓜环[7]在制备用于抑制由百草枯引起的炎症因子水平升高的药物中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述炎症因子选自肿瘤坏死因子、白细胞介素及干扰素。
5. 瓜环[7]在制备用于减少由百草枯引起的组织器官损伤的药物中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述组织器官选自肠道、心、肝、脾、肺和肾。
7. 一种用于治疗百草枯中毒的解毒剂,其特征在于,其含有治疗有效量的瓜环[7]以及药学上可接受的辅料。
8. 根据权利要求7所述的解毒剂,其特征在于,所述解毒剂的剂型为口服剂型。
9. 根据权利要求8所述的解毒剂,其特征在于,所述口服剂型为片剂、悬浊液、粉剂、胶囊、颗粒剂、丸剂或糖浆。
10. 一种治疗百草枯中毒的方法,其特征在于,其包括:向主体施用有效量的瓜环[7]。

瓜环[7]在百草枯解毒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及百草枯解毒技术领域,具体而言,涉及瓜环[7]在百草枯解毒中的应用。

背景技术

[0002] 百草枯,化学名称是1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶阳离子盐二氯化物,化学式: $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$,是一种快速灭生性除草剂,具有触杀作用和一定内吸作用。能迅速被植物绿色组织吸收,使其枯死。对非绿色组织没有作用。在土壤中迅速与土壤结合而钝化,对植物根部及多年生地下茎及宿根无效。

[0003] 百草枯(PQ)是世界上应用最广的农药,意外或主动吞服PQ会迅速导致多器官衰竭,死亡率达60%。在临床中,多用活性炭洗胃进行PQ的早期治疗,实际结果却收效甚微。因此,非常需要开发有效、特异的PQ解毒剂。

[0004] 世界范围内,每年约有10万人因农药中毒死亡,而在很多发展中国家,PQ可能是引起死亡最多的一种农药。意外或主动吞服PQ会迅速导致多器官衰竭,死亡率达60%。这样的后果可以归因于PQ的毒性以及目前解毒方法的缺乏。尽管有些国家已经禁止或者开始管制PQ的应用,但是仍然超过九十多个国家及地区登记注册或违法使用。这意味着仍有很多人正面临PQ中毒的威胁。然而目前临床治疗中没有特异有效的解毒剂,只有常规急救措施用于PQ解毒。此类措施包括洗胃(如利用活性炭),抗氧治疗,免疫抑制,血液灌注,血液透析,急救及支撑疗法。不幸的是,此类治疗措施在临床中并没有较好的效果,到目前为止仍未有用于PQ解毒的特效方法。口服吞咽PQ之后,其将在小肠部位迅速吸收,进而分布到各个器官包括,肝脏,心脏,脾脏,肺,肾脏及肌肉组织中。所以,在第一时间减少PQ的吸收可能是治疗PQ中毒的有效手段。因此,开发具有特异有效的口服解毒剂对于PQ中毒的治疗至关重要。

[0005] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供瓜环[7]在百草枯解毒中的应用,本发明的研究显示瓜环[7]可以在胃肠道中与百草枯(PQ)形成复合物,减少PQ的肠道吸收,进而达到解毒效果,瓜环[7]可以作为PQ中毒的特效口服解毒剂。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种用于治疗百草枯中毒的解毒剂,该解毒剂可以在胃肠道中与PQ形成复合物,减少PQ的肠道吸收,具有解毒效果。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种治疗百草枯中毒的方法,采用该方法可以对百草枯解毒。

[0009] 本发明是这样实现的:

[0010] 瓜环[n](CB[n]s, n=5-8,10,13-15)分子是通过亚甲基桥联核苷单体形成的一类低聚物,外形似南瓜。作为超分子化学中一类新兴的主体分子家族,近几年受到越来越多的关注。作为一类人工合成的纳米受体,瓜环能够结合一系列客体分子诸如芳香族或者脂肪

族化合物。

[0011] 本发明的研究实验结果显示:瓜环[7]可以在胃肠道中与PQ形成复合物,减少PQ的肠道吸收,进而达到解毒效果;在体外条件下,瓜环[7]的结合能够抑制PQ被细胞摄取,同时增加细胞活性。在临床前的小鼠实验中发现,口服瓜环[7]能够显著降低肠道对PQ的吸收,降低PQ的血药浓度及主要组织分布,进而缓解器官损伤,最终能够提高PQ中毒小鼠的生存率及生存时间,瓜环[7]能作为PQ中毒的特效口服解毒剂,用于百草枯解毒中。

[0012] 基于此,一方面,本发明提供了瓜环[7]在制备用于治疗百草枯中毒的解毒剂中的应用。

[0013] 另一方面,本发明提供了瓜环[7]在制备用于抑制由百草枯引起的细胞活性氧水平升高或细胞调亡的药物中的应用。

[0014] 本发明的体外实验研究结果显示,用PQ孵育细胞,细胞内活性氧的产生能够升高约6至7倍。而在瓜环[7]存在的条件下,细胞活性氧水平下降明显,相应的PQ引起的细胞调亡也同样在瓜环[7]存在的条件下被显著抑制。

[0015] 因此,瓜环[7]可以用于制备抑制由PQ引起的细胞活性氧水平升高或细胞调亡的药物。

[0016] 另一方面,本发明提供了瓜环[7]在制备用于抑制由百草枯引起的炎症因子水平升高的药物中的应用。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,所述炎症因子选自肿瘤坏死因子、白细胞介素及干扰素。

[0018] 本发明的体内实验研究结果显示,PQ在回肠部位引起的炎症因子如肿瘤坏死因子,白细胞介素及干扰素的含量在同时口服给予瓜环[7]时显著降低,此外,PQ引起的回肠部位髓过氧化物酶的高表达,及活性氧水平如过氧化氢及其他超氧化物水平的升高,在瓜环[7]同时给予时,此类数值也均显著下降。

[0019] 因此,瓜环[7]可以制备用于抑制由百草枯引起的炎症因子水平升高的药物。

[0020] 另一方面,本发明提供了瓜环[7]在制备用于减少由百草枯引起的组织器官损伤的药物中的应用。

[0021] 在本发明的一些实施方案中,所述组织器官选自肠道、心、肝、脾、肺和肾。

[0022] 本发明的体内实验研究结果显示,口服给予小鼠PQ后,在苏木素-伊红染色(HE)的小鼠十二指肠切片中可以观察到肠道上皮细胞的损伤及炎症细胞的浸润,以及白细胞数(WBC),红细胞数(RBC),血小板(PLT),血红蛋白浓度(HGB)以及肝肾功能指标如肌酐(CREA)及天冬氨酸转氨酶(AST)这些指标均显著升高;而同时口服给予PQ和瓜环[7]的混合液的小鼠肠道未观察到明显的损伤,且其WBC,RBC,PLT,HGB以及CREA及AST等指标均处于正常值范围。

[0023] 因此,瓜环[7]可以制备用于减少或减缓或缓解由百草枯引起的组织器官例如肠道、心、肝、脾、肺和肾损伤的药物。

[0024] 另一方面,本发明还提供了一种用于治疗百草枯中毒的解毒剂,其含有治疗有效量的瓜环[7]以及药学上可接受的辅料。

[0025] 在本发明的一些实施方案中,所述解毒剂的剂型为口服剂型。

[0026] 在本发明的一些实施方案中,所述口服剂型为片剂、悬浊液、粉剂、胶囊、颗粒剂、

丸剂或糖浆。

[0027] PQ的口服吸收剂必须能够在胃肠道部位有效结合PQ。活性炭(AC)基于其自身的高比表面积能够吸附药物或者毒素,常被应用于洗胃。在临床治疗PQ口服中毒时,由于并无特异解毒剂,活性炭亦常被推荐用于PQ中毒的洗胃。

[0028] 然而,临床对照研究并未证明活性炭用于农药中毒治疗的有效性。而本发明将瓜环[7]作为治疗百草枯中毒的解毒剂具有以下特点:

[0029] 1.良好的口服生物相容性使其能够大剂量的给予;

[0030] 2.与PQ具有强结合能力使其在胃肠道部位能够特异有效地捕获PQ;

[0031] 3.在胃肠道形成的复合物能够减少PQ的吸收,抑制由百草枯引起的细胞活性氧水平升高、细胞凋亡、炎症因子水平升高以及减少组织器官损伤、提高中毒小鼠的生存率、延长中毒小鼠的生存时间。

[0032] 另一方面,本发明提供了一种制备瓜环[7]的方法,其包括:在搅拌状态下往胍脲和多聚甲醛的混合粉末中滴加浓盐酸,然后加热至97-102℃保持18-22小时,得到含瓜环[7]的混悬液。

[0033] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,上述制备方法包括:

[0034] 将100g胍脲与42.2g多聚甲醛粉末充分混合;

[0035] 边剧烈搅拌边滴加浓盐酸142mL;

[0036] 静置30分钟后加热至100℃并保持搅拌20小时;

[0037] 混悬液冷却至室温后,按常规方法分离得到瓜环[7]。

[0038] 另一方面,本发明提供了一种治疗百草枯中毒的方法,其包括:向主体施用有效量的瓜环[7]。

[0039] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,上述主体为人。

[0040] 总之,本发明的研究首次发现瓜环[7]在不同条件例如在pH 1.2,pH 3.0,pH 4.5,pH 6.8,pH 7.4等环境下都能够有效地结合PQ,抑制其被细胞的摄取,进而增加细胞的活性。小鼠模型中,在给予PQ的同时口服瓜环[7]能够显著降低PQ的血药浓度及组织分布,缓解PQ引起的主要器官(包括肠道,心,肝,脾、肺及肾脏)的损伤,减轻血常规的异常。同时口服PQ及瓜环[7]的小鼠均存活下来,与之相对应的单独口服PQ的小鼠却全部死亡;在给予PQ两小时以内口服瓜环[7]能够显著增加小鼠的生存率与生存时间,而给予活性炭却没有显示相应的治疗效果。

[0041] 因此,瓜环[7]能够在胃肠道特异性结合PQ,进而抑制其吸收,瓜环[7]可以用于PQ解毒,作为PQ中毒的解毒剂,其解毒示意图如图1所示,瓜环[7]经口服后,在胃肠道与PQ结合,大部分PQ以复合物的形式排出体外。

附图说明

[0042] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0043] 图1为瓜环[7](CB[7])用于PQ解毒的示意图;CB[7]经口服后,在胃肠道与PQ结合,

最终大部分PQ以复合物的形式排出体外。

[0044] 图2为PQ与CB[7]的结合。

[0045] 图中：(A) CB[7] (左) 与PQ (右) 结构。(B) AutoDockVina模拟得到的CB[7]与PQ²⁺最优构象。(C) 不同pH条件下CB[7]与PQ的结合常数。(D) 25℃条件下CB[7]与PQ在pH7.4PBS中的ITC结果。

[0046] 图3为CB[7]对PQ解毒效果的细胞评价及PQ与PQ@CB[7]的细胞摄取实验。

[0047] 图中：(A) RAW264.7细胞孵育在PQ或不同摩尔比的PQ@CB[7]溶液中24h后的细胞活性。(B) RAW264.7细胞孵育在PQ (0.5mM) 或PQ@CB[7] (摩尔浓度分别为0.5和2mM) 不同时间后细胞内的PQ含量。(C和D) RAW264.7细胞孵育在CB[7] (2mM), PQ (0.5mM) 和PQ@CB[7] (0.5和2mM) 6, 12小时后细胞内活性氧水平流式细胞术结果及统计图。(E和F) RAW264.7细胞孵育在CB[7] (2mM), PQ (0.5mM) 和PQ@CB[7] (0.5和2mM) 12, 24小时后细胞凋亡流式细胞术结果及统计图。

[0048] 图4为CB[7]减少PQ在肠道的累积以及保护其免受损伤。

[0049] 图中：(A-C) 口服给予小鼠300mg/kg的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 4, 8小时后, PQ在十二指肠, 空肠, 回肠的累积。(D-I) 口服给予小鼠300mg/kg的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 8小时后, 在空肠部位促炎因子及活性氧水平。(J和K) 口服给予小鼠300mg/kg的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 8小时后, 在回肠部位促炎因子及过氧化氢水平。(L) 口服给予小鼠300mg/kg的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 8小时后, 十二指肠HE染色切片组织病理学分析, 标尺 = 200μm。

[0050] 图5为CB[7]减少PQ的吸收及组织分布、缓解PQ引起的毒性。

[0051] 图中：(A和B) 小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 不同时间血液中PQ浓度, 数据表示为平均值±标准误, n=6. (B) AUC曲线下面积。(C和D) 小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 不同时间肝脏, 肺脏中PQ的分布。数据表示为平均值±标准误, n=6. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. (E-I) 小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 8小时后肺脏中炎症因子及ROS水平。数据表示为平均值±标准误, n=6. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. (J-L) 小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:2, CB[7] = 2.71g/kg) 24小时后血常规及肝肾功水平。数据表示为平均值±标准误, n=6, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

[0052] 图6为PQ@CB[7]复合物能增加小鼠的生存率。

[0053] 图中：(A) 给药方式 (B) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ, PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:1或1:2, CB[7] = 1.36或2.71g/kg) 和PQ@AC (AC = 1.5g/kg) 的Kaplan-Meier生存曲线. n = 8, log-rank test, ***P<0.001, PQ@CB[7] 与PQ组比较。(C-E) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ, PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:1或1:2, CB[7] = 1.36或2.71g/kg) 后21天生存的小鼠血常规及肝肾功指标, 数据表示为平均值±标准误, n=8, *P<0.05. (F) 小鼠经口服给予600mg/kg的PQ, PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7] = 1:1或1:2, CB[7] = 2.71或5.42g/kg) 的Kaplan-Meier生存曲线. n=8, log-rank test, ***P<0.001, PQ@CB[7] (1:1) 组与PQ组比

较。 $n=8$, log-rank test, $***P<0.001$, PQ@CB[7] (1:2) 组与PQ组比较。

[0054] 图7为CB[7]增加超致死剂量的PQ中毒小鼠的生存率。

[0055] 图中: (A) 给药方式。(B) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ 10分钟后, 口服给予CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:1, 1:2或1:3, CB[7]=1.36, 2.71或4.07g/kg) 后的小鼠Kaplan-Meier生存曲线。 $n=8$, log-rank test, $***P<0.001$, 与PQ组比较。(C) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ 0.5, 1, 2小时后, 口服给予CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:2, CB[7]=2.71g/kg) 后的小鼠Kaplan-Meier生存曲线。 $n=8$, log-rank test, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与PQ组比较。(D) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ后10分钟, 0.5, 1, 2小时后, 口服给予AC (1.5g/kg) 后的小鼠Kaplan-Meier生存曲线。 $n=8$ 。(E) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ 1小时后, 口服给予CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:2, CB[7]=2.71g/kg) 21天后存活的小鼠主要脏器的HE染色切片组织病理学分析, 标尺=100 μ m。(F) 小鼠经口服给予300mg/kg的PQ 10分钟, 0.5, 1小时后, 口服给予CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:2, CB[7]=2.71g/kg) 21天后存活的小鼠空肠HE染色切片组织病理学分析, 标尺=200 μ m。

[0056] 图8为A549及L02细胞中CB[7]对PQ的解毒作用。

[0057] 图中: (A) A549细胞孵育在不同浓度的PQ或者PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:1) 24小时后的细胞活性。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=5$, $***P<0.001$ 。(B) A549细胞孵育在PQ@CB[7] (PQ=0.5mM, CB[7]=0, 0.2, 0.5, 1和2mM) 24小时后的细胞活性。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=5$, $***P<0.001$ 。(C) L02细胞孵育在不同浓度的PQ或者PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:1) 24小时后的细胞活性。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=5$, $***P<0.001$ 。(D) L02细胞孵育在PQ@CB[7] (PQ=0.5mM, CB[7]=0, 0.2, 0.5, 1和2mM) 24小时后的细胞活性。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=5$, $*P<0.05$, $***P<0.001$ 。

[0058] 图9为PQ口服毒性评价结果。小鼠经口服途径给予PQ后的体重变化及生存率。数据表示为平均值+标准误, $n=8$ 。

[0059] 图10为PQ口服急性毒性评价后的小鼠脏器指数。小鼠经口服途径给予不同剂量的PQ后21天存活的小鼠脏器指数。数据表示为平均值 \pm 标准误, 对照组与150mg/kg组 ($n=6$), 100mg/kg组 ($n=8$) 和200mg/kg组 ($n=5$)。

[0060] 图11为Caco-2细胞孵育在PQ (0.5mM) 或PQ@CB[7] (摩尔浓度分别为0.5和2mM) 不同时间后细胞内的PQ含量 ($n=3$)。

[0061] 图12为PQ&EQ (乙基紫精) 及 (PQ&EQ) @CB[7] 溶液的高效液相色谱图。10 μ g/mL CB[7] 存在 (下图) 或不存在 (上图) 条件下的1 μ g/mL PQ (S) 和1.5 μ g/mL EQ (IS) 的色谱图。

[0062] 图13为CB[7]减少PQ在心, 脾及肾脏中的分布。小鼠经口服给予300mg/kg PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:2, CB[7]=2.71g/kg) 后不同时间的脏器分布。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

[0063] 图14为小鼠经口服给予PQ和PQ@CB[7] 24小时后脏器HE染色切片分析。小鼠经口服给予300mg/kg PQ或PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:2, CB[7]=2.71g/kg) 后24小时的脏器HE切片。数据表示为平均值 \pm 标准误, 标尺=100 μ m。

[0064] 图15为小鼠经口服给予PQ和PQ@CB[7]的体重变化及21天后脏器指数。

[0065] 图中: (A) 小鼠经口服给予生理盐水 (control组, $n=6$), 300mg/kg剂量的PQ ($n=8$) 及PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:1或1:2, CB[7]=1.36或2.71g/kg, $n=8$) 后体重变化。数

据表示为平均值±标准误。(B)小鼠经口服给予生理盐水(control组,n=6),300mg/kg剂量的PQ@CB[7](摩尔比PQ/CB[7]=1:1或1:2,CB[7]=1.36或2.71g/kg,n=8)21天后的脏器指数,数据表示为平均值±标准误。

[0066] 图16为小鼠经口服给予300mg/kg当量PQ的PQ@CB[7](摩尔比为1:1或1:2)后21天内存活小鼠的脏器切片HE染色分析,标尺=200 μ m。

[0067] 图17为小鼠经口服给予生理盐水(control组,n=6),600mg/kg剂量的PQ@CB[7](摩尔比PQ/CB[7]=1:1或1:2,n=8)后体重变化。数据表示为平均值±标准误。

[0068] 图18为小鼠经口服300mg/kg剂量PQ 10分钟、30分钟后给予CB[7](摩尔比PQ/CB[7]=1:2,CB[7]=2.71g/kg,)治疗后21天存活小鼠的主要脏器HE染色切片。标尺=100 μ m。

[0069] 图19为小鼠经口服300mg/kg剂量PQ 10分钟,30分钟,1小时后给予CB[7](摩尔比PQ/CB[7]=1:2)治疗后21天存活小鼠的肠道HE染色切片。标尺=200 μ m。

具体实施方式

[0070] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0071] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0072] 材料:

[0073] 动物与细胞

[0074] 雄性Ba1b/c小鼠购买自第三军医大学实验动物中心。所有动物实验研究均符合中华人民共和国卫生部动物管理条例(No.55,2001)及第三军医大学实验动物保护及使用指导原则。动物均基于体重随机分组。

[0075] 小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞,人肺癌A549细胞及正常人肝L02细胞培养在37度/0.5%二氧化碳培养箱中,培养基为DMEM完全培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素。人结肠Caco-2细胞(30-40代)培养在同样的环境中,培养基另外添加1%非必需氨基酸。

[0076] 实施例1

[0077] 瓜环[7]的合成

[0078] 100g胍脲与42.2g多聚甲醛粉末充分混合。边剧烈搅拌边滴加浓盐酸142mL。静置30分钟后加热至100度并保持20小时。混悬液冷却至室温后,利用文献报道方法(J.Org.Chem.66,8094-8100(2001))分离瓜环[7](以下简称为CB[7])。

[0079] 实施例2

[0080] CB[7]与PQ结合模型

[0081] 1方法:

[0082] 用ChemBioOffice Ultra 14.0软件画出CB[7]与PQ的三维结构,利用AutoDock Tools生成pdb文档。CB[7]与PQ的结合过程利用AutoDock Vina进行模拟。

[0083] 晶格计算范围设定为40 \AA \times 40 \AA \times 40 \AA ,晶格计算单元为0.375 \AA 。搜寻空间中心设定为-3.066 \AA , -0.011 \AA , 和-0.086 \AA (x,y,z)。GA运行次数设定为100次,其他参数为AutoDock Vina默认值。利用拉马克遗传算法进行构像搜索。能量最小化的复合物结构用

ChemBioOffice Ultra 14.0进行优化。

[0084] 2结果:

[0085] 利用AutoDock Vina模拟了PQ与CB[7]的结合,具有最低能量的复合物结构形态见图2。图2A左侧显示了瓜环[7]的结构,右侧显示了PQ的结构。图2B显示了AutoDock Vina模拟得到的CB[7]与PQ²⁺结合最小能量时的构象。

[0086] 在pH 7.0的Tris缓冲液中,CB[7]与PQ能够形成1:1的稳定复合物,其结合常数为 $2.0 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 。而人体胃肠道的pH环境会基于年龄及健康状况在pH 1.0到pH 7.4范围上下波动。因此,我们通过等温量热滴定的方式测定了CB[7]与PQ在pH 1.2盐酸盐溶液,pH 3.0,pH 4.5,pH 6.8,pH 7.4磷酸盐缓冲液及水中的结合能力。

[0087] 利用等温滴定量热法测定CB[7]与PQ的结合常数与热力学行为的方法如下:

[0088] 0.2mL CB[7] (0.2mM) 水溶液置于样品槽中。将每次2 μL 的2mM PQ水溶液连续滴定19次,每次间隔时间为150s,在25度记录热量释放。所得数据利用仪器自带软件进行分析拟合。热力学参数分析利用单一结合位点数学模型进行分析。用同样的方式测定CB[7]与PQ在其他pH1.2盐酸盐溶液及pH3.0,4.5,6.8,7.4磷酸盐缓冲液中的结合力。

[0089] 结果显示其结合常数均超过 10^5M^{-1} ,表明CB[7]在胃肠道环境与PQ具有较高的结合能力(图2C),图2D显示了CB[7]与PQ在pH 7.4PBS中的ITC滴定结果,滴定过程中显示出明显的放热。

[0090] 实施例3

[0091] CB[7]对PQ解毒作用的体外实验

[0092] 实施例2证明了CB[7]在不同pH环境下均能够有效结合PQ,本实施例中,我们通过体外细胞实验评价了CB[7]对PQ的解毒作用。我们利用一个常用于体外细胞毒性评价的巨噬细胞系RAW264.7研究了CB[7] (摩尔比1:1)在不同PQ浓度下的保护作用。

[0093] 1方法如下:

[0094] 1.1细胞活性测定

[0095] 将细胞种植于96孔板12小时后,加入含有或不含CB[7]的不同浓度的PQ。利用CCK-8方法测定所设定时间的细胞活性。

[0096] 1.2细胞凋亡测定

[0097] 将 2×10^5 RAW264.7细胞混悬于1mL培养基中种植于12孔板中。加入含有或者不含CB[7]的不同浓度的PQ进行孵育。在设定时间点收集细胞,按照说明书利用碘化丙啶及Annexin V-FITC进行染色,用流式细胞术测定细胞凋亡。

[0098] 1.3活性氧检测

[0099] 利用DCFH-DA法测定细胞内活性氧的产生。将 2×10^5 RAW264.7细胞混悬于1mL培养基中种植于12孔板中,12小时后加入含有或者不含CB[7]的不同浓度的PQ进行孵育。于设定时间点用pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,加入含有10 μM DCFH-DA的无血清DMEM培养基于37度孵育20分钟。PBS洗涤三次后收集细胞,利用流式细胞术测定荧光强度。

[0100] 1.4细胞内PQ含量测定

[0101] 将 5×10^5 RAW264.7细胞混悬于1mL培养基中种植于12孔板中,12小时后加入含有或者不含CB[7]的不同浓度的PQ进行孵育。在设定时间点,用PBS洗涤细胞三次后,加入300 μL RIPA裂解液(含1%蛋白酶抑制剂)裂解。

[0102] 样品收集后于10000g离心5分钟。上清液收集后于-20度储存。上清液中蛋白含量用BCA法测定。关于PQ浓度的测定,200 μ L上清液中加入50 μ L甲醇,充分混悬3分钟后放置于-20 $^{\circ}$ C 10分钟。于10000g离心10分钟后,利用HPLC-UV测定上清液中的PQ浓度。流动相为10%乙腈和90%缓冲液,缓冲液组成为含有0.1M磷酸及3.0mM辛烷磺酸钠,用二乙胺调节pH至3.0。色谱柱为ZORBA X Eclipse XDB-C18 (4.6 \times 250mm,5 μ m)。流速为0.8mL/分钟,检测波长258nm。PQ含量表示为PQ/蛋白质含量比值。

[0103] 2结果如下:

[0104] 上述各指标检测的结果如图3所示。

[0105] 如图3A所示,在24小时内PQ引起了细胞死亡并且此效应呈浓度依赖性,但是CB[7] (PQ@CB[7]摩尔比1:1)的加入能够有效抑制其细胞毒性,其抑制效果亦呈浓度依赖性。在A549细胞(人肺癌上皮细胞)及L02细胞(人肝细胞)中同样得到了类似的结果(图8,A-D)。

[0106] 为了探讨CB[7]对PQ细胞毒性的保护作用,通过测定细胞内PQ含量我们发现CB[7]的加入能够显著抑制PQ的细胞摄取(图3-B)。研究证明,当进入细胞内后,PQ能够通过引起氧化循环从而产生活性氧,进而引起细胞毒性产生细胞凋亡及死亡。

[0107] 因此,我们进一步研究了CB[7]对PQ引起的细胞活性氧产生及细胞凋亡的影响。RAW264.7细胞孵育PQ 6及12小时,其活性氧的产生能够升高约6至7倍。而在CB[7]存在的条件下,细胞活性氧水平下降至对照组水平(图3-C/D)。相应的PQ引起的细胞凋亡也同样在CB[7]存在的条件下被显著抑制(图3-E/F)。

[0108] 因此,以上研究证明,CB[7]能够抑制PQ的细胞摄取,进而减少活性氧的产生及细胞凋亡,最终提高细胞活性。

[0109] 实施例4

[0110] CB[7]对PQ解毒作用的体内实验

[0111] 1PQ的超致死剂量

[0112] 所用小鼠为雄性Balb/c小鼠(8-10周),体重为20-25g。实验遵循第三军医大学实验动物保护与使用指导原则。禁食8小时后,小鼠经口服给予剂量为100,150,200,250,300,350mg/kg的PQ溶液。每天记录生存小鼠只数及小鼠体重。每日观察小鼠行为及疾病征兆。

[0113] 为了考察PQ的在体毒性,通过口服途径给予了小鼠100,150,200 250,300,350mg/kg剂量的PQ。在给予150mg/kg剂量PQ时,小鼠的体重急剧下降(图9-A),在21天时死亡率达25%(图9-B)。而当PQ剂量达到250,300,350mg/kg时,小鼠体重下降更加迅速,并且小鼠在给药3-4天内全部死亡(图9-B)。

[0114] 出乎意料的是,在低剂量PQ组(100-200mg/kg)存活下来的小鼠,其体重在给药5天后开始上升,而在21天时其体重及脏器指数与对照组并无显著差异(图9,图10),这可能是由于小鼠具有一定的自愈能力。基于以上结果,我们选择300mg/kg超致死剂量作为给药剂量来评价CB[7]的口服解毒效果。

[0115] 2方法:

[0116] 2.1样品收集

[0117] 总计84只小鼠用于实验测定小鼠的血药浓度及组织分布。8-10周龄体重为20-25g雄性Balb/c小鼠口服给予300mg/kg剂量PQ或PQ@CB[7] (摩尔比1:2,CB[7]=2.71g/kg)。10分钟,30分钟,1,2,4,8,12小时后,用肝素钠涂布管收集血液,分离血浆保存于-80 $^{\circ}$ C,备用。

4,8,12小时后收集主要脏器如心,肝,脾,肺,肾以及肠道,用预冷的PBS洗涤后保存于-80℃,备用。

[0118] 2.2样品预处理

[0119] 按照参考文献(J.Chromatogr.B 775,109-113(2002))进行血浆的预处理。5μL150μg/mL乙基紫精水溶液加入至200μL血浆样品中,加入45μL 6%的高氯酸甲醇溶液充分混悬。样品置于-20℃中10分钟后,8000g离心10分钟。上清液再次离心后HPLC进行分析。

[0120] 组织预处理过程与前期报道方法(J.Chromatogr.B 527,189-195(1990))稍有不同。主要脏器心,肝,脾,肺,肾称重后置于离心管中。将样品剪碎后加入1mL或2mL(肝脏)含0.1%Triton-X100的PBS进行匀浆。样品经8000g离心10分钟后,取上清液再次离心后,取上清液按照处理血浆样品的方法进行处理后进行HPLC分析。

[0121] 小肠按照十二指肠、空肠、回肠分别截取三段,每段5厘米。称重后,于1mL 0.1% Triton-X100的PBS中匀浆,离心两次后,取上清液按照处理血浆样品的方法进行处理后进行HPLC分析。

[0122] 标准品制备通过将PQ水溶液加入到空白血浆或者空白组织匀浆液上清液中,制备成含有PQ浓度为0,0.5,1,2,5,10,20,50μg/mL的样品。经过与处理血浆样品的方法进行处理后进行HPLC分析。

[0123] 2.3HPLC分析

[0124] HPLC分析过程与前期报道方法(J.Chromatogr.B 775,109-113(2002))稍有不同。流动相组成与测定细胞内PQ含量相同。色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6×250mm,5μm),预柱为C18柱(4.6×10mm,5μm),柱温为37℃。流速为0.8mL/分钟,检测波长为258nm。

[0125] 2.4曲线下面积计算

[0126] 血浆浓度时间曲线下面积通过软件DAS 3.2.3pharmacokinetic program计算。

[0127] 2.5炎症因子及活性氧水平测定

[0128] 雄性Balb/c(8-10周),体重为20-25g小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7](摩尔比1:2,CB[7]=2.71g/kg)溶液,8小时后,收集肺及小肠样品,用预冷的PBS清洗。从小肠截取每段5cm的空肠及回肠样品。肺及空肠,回肠置于离心管中,加入1mL预冷的PBS匀浆。样品经8000g离心10分钟后,取上清液测定炎症因子及活性氧水平。细胞因子包括肿瘤坏死因子TNF-α,γ干扰素(IFN-γ),白细胞介素1α(IL-1α)及髓过氧化物酶(MPO)根据样品说明书测定。相对超氧化物水平利用购自碧云天公司的试剂盒测定。荧光过氧化氢测定试剂盒(sigma公司)用来测定过氧化氢水平。过氧化物酶底物与过氧化氢反应后,利用多功能酶标仪测定样品荧光。

[0129] 2.6小鼠主要脏器的毒性检测

[0130] 雄性Balb/c(8-10周),体重为20-25g小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ或PQ@CB[7](摩尔比1:2,CB[7]=2.71g/kg)溶液后测定CB[7]对PQ引起的组织损伤及血常规异常的保护作用。对照组小鼠给予100μL生理盐水/10g体重。在给药后24小时取血测定血常规及肝肾功指标,给药8,24小时后取主要脏器心,肝,脾,肺,肾用PBS清洗。取胃肠道组织用PBS清洗。对主要脏器及胃肠道组织进行切片并进行HE染色进行组织病理学分析。

[0131] 雄性Balb/c(8-10周),体重为20-25g小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ,PQ@CB[7](摩尔比1:1或1:2,CB[7]=1.36或2.71g/kg)溶液或PQ@AC(活性炭,剂量为1.5g/kg 200

目)。对照组小鼠口服给予100 μ L生理盐水/10g体重。每天记录生存小鼠只数及小鼠体重。每日观察小鼠行为及疾病征兆。21天后,取血测定肝肾功及血常规指标。收集主要脏器心,肝,脾,肺,肾称重计算脏器指数。胃肠道收集后用PBS清洗。主要脏器及胃肠道切片用HE染色进行组织病理学分析。采用相同的方法评价小鼠经口服给予600mg/kg的PQ及PQ@CB[7] (摩尔比PQ/CB[7]=1:1or 1:2,CB[7]=2.71or 5.42g/kg)的生存率。

[0132] 3结果

[0133] 3.1PQ口服后能够使肠道黏膜损伤严重从而进一步促进PQ的吸收。为了研究CB[7]能否抑制PQ在肠道部位的聚集进而减少其损伤,我们先利用结肠癌上皮细胞Caco-2细胞作为模型来考察CB[7]对细胞摄取PQ的影响。当细胞在PQ@CB[7] (0.5mM PQ+2mM CB[7])混合溶液中孵育0.5,1,2,4,8小时,其细胞内浓度相比于其孵育在PQ (0.5mM) 溶液中显著减少(图11)。说明CB[7]的加入抑制了PQ的细胞摄取,此结果与利用RAW264.7细胞所得到的结果一致。

[0134] 3.2为了研究CB[7]能否降低PQ引起的肠道损伤,小鼠口服给予了超致死剂量300mg/kg的PQ以及PQ@CB[7]的混合液(PQ与CB[7]摩尔比为1:2,CB[7]=2.71g/kg)。通过口服途径给予PQ 8小时后,能够观察到小鼠肠道出血,而在同时给予PQ@CB[7]的混合液的小鼠,此症状完全消除。

[0135] 3.3另外,口服途径给予PQ 4小时后,PQ在小鼠十二指肠(duodenum),空肠(jejunum)及回肠(ileum)部位的分布约为60,110及325 μ g/g,而在给予PQ@CB[7]的混合液的小鼠中,其分布分别为30,40及100 μ g/kg(图4,A-C),这说明在小鼠肠道的各个部位,CB[7]显著减少了PQ的分布。在8小时也得到了类似的结果。

[0136] 值得注意的是,CB[7]并不影响高效液相色谱对PQ的检测(图12),同时HPLC并不能区分PQ@CB[7]混合液在组织中游离或结合状态的PQ的含量。

[0137] 另外,PQ在空肠部位引起的炎症因子如TNF- α ,IFN- γ 及IL-1 α 的含量在同时口服给予CB[7]时显著降低(图4,D-F)。同时,PQ能够引起空肠部位MPO的高表达,及活性氧水平如过氧化氢及其他超氧化物水平的升高(图4,G-I)。而当CB[7]同时给予时,此类数值均显著下降。在回肠中亦得到相类似的结果(图4,J-K)。

[0138] 另外,口服给予PQ后,在苏木素-伊红染色(HE)的小鼠十二指肠切片中可以观察到上皮细胞的损伤及炎症细胞的浸润,而在对照组小鼠以及同时口服给予PQ@CB[7]的混合液的小鼠未观察到明显的损伤(图4L)。

[0139] 值得注意的是,在小鼠口服给予PQ@CB[7]的混合液时,在肠道组织中能够检测到PQ,但是在肠道部位的促炎因子及活性氧水平却与对照组无明显增加,亦没有观察到肠道的损伤。其原因可能是CB[7]与PQ的结合减少了PQ的肠道吸收而此结合状态的PQ@CB[7]可能并不会引起活性氧的产生,炎症以及肠道的损伤。

[0140] 因此,以上结果显示,CB[7]能够通过和PQ的结合抑制其在肠道的分布进而减少肠道损伤。

[0141] 3.4我们进一步评价了CB[7]对PQ经口服在小鼠体内的药物动力学,吸收,组织分布及对小鼠主要脏器毒性的影响。小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ溶液或者PQ@CB[7]混悬液(PQ与CB[7]摩尔比为1:2,CB[7]=2.71g/kg),图5A表示两组的药物动力学参数。小鼠经口服给予PQ溶液后,PQ的血药浓度在取样的第一个点10分钟即达到最高值,并且在2h内

一直保持较高水平,这说明了PQ吸收迅速(图5A)。

[0142] 当PQ与CB[7]同时给予时,小鼠体内PQ血药浓度在10分钟,0.5,1,2,4,8以及12小时均相较于单独给予PQ显著下降。相应的PQ@CB[7]组曲线下面积AUC(0-2h),AUC(0-4h),AUC(0-12h) and AUC(0-∞)分别为3.3,6.5,9.6以及10.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$,相较于PQ组的结果(17.5,24.3,42.5和197.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$,图5B)分别降低了5.4,3.8,4.4及21.2倍。PQ@CB[7]组主要脏器如心、肝、脾、肺、肾在4,8及12小时的PQ累积量均相比于PQ组显著降低(图5,C-D;图13,A-C)。PQ吸收减少的原因可能是与CB[7]形成了复合物有关。

[0143] 另外,因为PQ较容易在肺部聚集,我们评价了在CB[7]存在条件下PQ对肺部的损伤情况。毫无疑问,经口服给予小鼠300mg/kg剂量的PQ 8小时后,肺部的促炎因子如IL-1 β 和IFN- γ ,MPO以及ROS水平如H₂O₂和超氧化物均显著升高。相反地,上述指标在口服给予PQ@CB[7]组(PQ与CB[7]摩尔比为1:2,CB[7]2.71g/kg)相比于单独给予PQ组均显著降低(图5,E-I)。

[0144] 另外,经口服给予PQ后,主要血常规指标如WBC,RBC,PLT,HGB以及CREA及AST,在经口服给予PQ24小时时,均显著升高,说明对肝肾有损伤(图5,J-L)。而上述指标在口服给予PQ@CB[7]组(PQ与CB[7]摩尔比为1:2,CB[7]2.71g/kg)均处于正常值(图5,J-L)。

[0145] 同时,在口服给予PQ8及24小时后,HE切片染色显示心,肝,脾,肺,肾均有明显损伤,而在口服给予PQ@CB[7]组只能观察到较小的损伤(图14)。

[0146] 3.5口服超致死剂量的PQ时小鼠的生存率

[0147] 目前临床进行口服PQ解毒时通常会灌服活性炭用来吸附PQ。一般用于成人药物解毒的活性炭推荐剂量为50-100g。在此,我们先评价了活性炭对于口服超致死剂量PQ的解毒效果。当小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ与活性炭(1.5g/kg)的混悬液(PQ@AC)时,21天生存率仅有12.5%(图6,A-B)。这表明,活性炭对于超致死剂量的PQ中毒并不能有效地解毒,这与临床统计结果一致。

[0148] 我们又进一步研究了当小鼠同时口服给予CB[7]与PQ时小鼠的生存率。意想不到的是,当小鼠经口服给予超致死剂量300mg/kg PQ当量的PQ@CB[7](摩尔比1:1或1:2,CB[7]=1.36,2.71g/kg)混悬液时,所有小鼠均存活下来。同时小鼠的体重均平稳上升(图15A)。更重要的是,21天后主要脏器指数(图15B),血常规,肝肾功指标均与正常对照组无显著差别(图6,C-E)。另外,在主要脏器心,肝,脾,肺,肾HE染色的切片中未观察到明显的损伤(图16)。

[0149] 上述结果显示CB[7]能够保护小鼠防止PQ中毒。然而,在PQ@CB[7](摩尔比1:1)组,HGB,PLT及ALT指标均显著升高(图6,C-D),说明当CB[7]量较少时不足以解除PQ的毒性。为了研究CB[7]对更高剂量PQ的解毒情况,我们考察了小鼠经口服给予600mg/kg剂量(约为人类致死剂量的20倍)PQ及PQ@CB[7](摩尔比1:1或1:2,CB[7]=2.71,5.42g/kg)的生存率。当小鼠经口服给予600mg/kg剂量PQ时,所有小鼠均在1天内死亡。而PQ@CB[7]组21天生存率为75%(PQ/CB[7]摩尔比1:1)和87.5%(PQ/CB[7]摩尔比1:2)。同时口服给予PQ@CB[7]混悬液组的小鼠体重变化与对照组保持一致(图17)。

[0150] 实施例5

[0151] 在突发状况下,吞服PQ的病人可能在数分钟或者几小时后才能接受医学治疗。我们进一步评价了CB[7]用作PQ解毒剂时的最佳剂量与时间。

[0152] 1方法:

[0153] 雄性Ba1b/c (8-10周), 体重为20-25g小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ。10分钟后口服给予CB[7]的生理盐水混悬液(PQ 1,2,3倍当量,CB[7]=1.36,2.71,及4.07g/kg)。对于利用CB[7]进行PQ解毒的时间依赖性研究,小鼠在口服给予300mg/kg PQ 0.5,1,2小时后,再口服给予2倍当量的CB[7]/生理盐水(2.71g/kg)混悬液。每天记录生存小鼠只数及小鼠体重。21天后,生存下来的小鼠取血测定血常规及肝肾功指标,取主要脏器称重计算脏器指数。主要脏器及胃肠道切片用HE染色进行组织病理学分析。对于利用活性炭AC进行PQ解毒的时间依赖性研究,小鼠在口服给予300mg/kg PQ 10分钟,0.5,1,2小时后,再口服给予1.5g/kg的活性炭混悬液。每天记录生存小鼠只数及小鼠体重。

[0154] 2结果:

[0155] 当小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ10分钟后,给予与PQ摩尔比为1:1的CB[7](1.36g/kg),小鼠最终全部死亡,但是相比于未治疗组在3天内全部死亡,其生存时间延长到了10天。

[0156] 而当小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ10分钟后,给予与PQ摩尔比为2:1的CB[7](2.71g/kg)时,21天生存率为40%(图7,A-B)。然而当CB[7]的量提高到摩尔比CB[7]/PQ为3:1时(CB[7]=4.07g/kg),虽然延长了生存时间但是并没有提高总体生存率。这可能是因为在短时间内给予PQ后又再次给予较高剂量的CB[7]引起了小鼠胃部的物理损伤。小鼠推荐最大灌胃剂量为10mL/kg。而在此实验中,小鼠在10分钟内的口服剂量为20mL/kg。而如果减低给药体积,增加CB[7]浓度便会使混悬液变粘稠进而无法完成灌胃操作。

[0157] 因此以上实验说明,当CB[7]剂量在与PQ摩尔比为2:1时比较适合用于PQ的解毒,增加PQ中毒小鼠生存率。进一步研究发现,当小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ 0.5,1,2小时后,给予与PQ摩尔比为2:1的CB[7](2.71g/kg)时,小鼠的生存率与生存时间均有所增加(图7C)。

[0158] 21天后,取小鼠主要脏器及肠道进行切片HE染色时,并未观察到显著损伤(图7,E-F;图18和图19),这说明在给予CB[7]治疗后的21天内,生存下来的小鼠均在一定程度上产生了自愈。然而,当小鼠经口服给予300mg/kg剂量的PQ10分钟,0.5,1,2小时给予临床推荐的活性炭后,所有的小鼠均在3天内死亡(图7D),这说明活性炭对于PQ的解毒并没有显著效果。

[0159] 以上实验充分说明,CB[7]具有成为一种用于PQ中毒的安全有效的口服解毒剂的前景。

[0160] 综上所述,PQ作为一种经济有效的除草剂广泛应用于或违法分布在90多个国家。然而,意外或自杀式服用PQ引起超过60%的死亡率,这使得PQ在很多国家中引起死亡的农药中排在前列。目前临床中用于治疗PQ中毒的措施主要是在接受其他措施前,先行洗胃以减少其吸收,而活性炭在临床中通常被推荐用于PQ中毒后的洗胃。然而,在此项实验中,对于超致死剂量的PQ中毒,活性炭并没有显示出解毒效果,这与前期研究保持一致。

[0161] 为了挽救患者生命,研究人员一直在研究新方法用于治疗PQ中毒。曾有研究制备了PQ特异性抗体用于PQ解毒,但是却无法防止PQ在组织中的累积。亦有研究报道水溶性柱芳烃能够结合PQ并且在细胞水平能够减少PQ的毒性。类似的磺酸化杯芳烃亦可以结合PQ并且提高PQ中毒小鼠的生存率。然而磺酸化杯芳烃的安全性及解毒机理并未充分研究。亦有

研究证明赖氨酸乙酰水杨酸,水杨酸钠及醌氧化还原酶2抑制剂对PQ中毒的大鼠具有解毒效果。然而在这些研究中,PQ是通过腹腔途径给药,而不是实际情况中通过口服途径中毒。

[0162] 为什么口服PQ如此剧毒?目前研究表明,当进入细胞内部后,PQ将引起氧化循环,引发一系列生物化学反应如产生自由基及氧化应激,NADPH的氧化,线粒体毒性,细胞内巯基氧化,进而氧化损伤脂质,DNA,蛋白质最终引起细胞凋亡及死亡。在体内,PQ在口服后主要在肠道部位被迅速吸收。而PQ在肺上皮细胞的累积将引起急性肺泡炎,进而引起肺水肿,肺纤维化及肺衰竭。PQ在肾脏中的累积将引起肾近曲小管空泡化及坏死。大剂量吞服PQ将迅速引起多器官衰竭,几小时或几天内便会死亡。而当前研究证明当利用CB[7]作为潜在口服解毒剂时,PQ在肠道的吸收大大减少,主要脏器的损伤亦得到缓解。

[0163] 在本发明研究中,我们证明CB[7]抑制了PQ的细胞摄取,减少了PQ引起的活性氧产生及细胞凋亡,进而提高了细胞活性。CB[7]与PQ在pH1.2-7.4环境下的高结合力促使CB[7]在肠道中能够迅速结合并隔绝PQ,进而减少了在肠道部位PQ的吸收及肠道损伤。药物动力学研究表明通过与CB[7]结合,PQ的血药浓度,主要脏器的生物分布均显著降低,PQ引起的多器官损伤亦相应地缓解。最终利用CB[7]作为解毒剂使PQ中毒的小鼠生存率及生存时间显著提升,相比之下活性炭并没有显著治疗效果。

[0164] 尽管上述结果表明在小鼠模型中CB[7]能够作为口服解毒剂用于PQ解毒,但仍然存在一些问题。我们发现CB[7]能够在胃肠道有效结合PQ进而减少其吸收与组织分布。然而,当小鼠口服给予PQ2小时后,CB[7]却不能降低死亡率。因此,当口服PQ超过2个小时,CB[7]将不再提升生存率。这可能是由于在两小时内,PQ已经迅速吸收进入血液循环(图5A)。因此,若想要在紧急事件发生时最大程度的提升PQ中毒患者的生存几率,CB[7]可以放置到人们获取PQ的乡镇村庄医院,急救车上,这样PQ中毒的患者就可以在野外或乡镇医院或者急救室便可以使用CB[7],进而尽快减少PQ的肠道吸收,然后再接受其他常规医疗措施,如血液透析或血液灌流。

[0165] 在最近的一项中国的研究中,医院收治PQ中毒病人的时间中位数在7小时(四分差范围5-10小时)。但实际情况是,病人在下级医院收治后可能已经进行了活性炭洗胃操作,然后再花费数小时的时间被送到所开展研究的医院(省级三级甲等医院)。正如一项在斯里兰卡的研究中,90%的PQ中毒的病人都是在其他下级医院检查或者初步治疗后才被转移至所进行研究的医院。因此,在乡镇医院及去往农村地区的救护车上把使用CB[7]作为解毒剂用于PQ中毒作为一种治疗选择,可能会增加患者的生存几率。

[0166] 考虑到临床转化中CB[7]的剂量问题,PQ对于人的半数致死剂量为35mg/kg,因此,若按照摩尔比2:1计算CB[7]的剂量为316mg/kg,换算成60kg的成人19g。我们最近的一项研究表明,单次口服给予小鼠5g/kg的CB[7]时,通过监测小鼠体重变化,21天后脏器指数,血常规,组织切片分析及肝肾功能发现CB[7]具有良好的生物相容性。另一项中文发表的研究中通过检测单次给予15g/kg剂量PQ的小鼠体重变化证明了CB[7]的良好生物相容性。因此,利用比表面积折算后,60kg的成人通过口服可以耐受73g的CB[7]。

[0167] 总之,本研究表明CB[7]有可能作为口服解毒剂用于PQ中毒,其效果优于利用活性炭吸附。除了抑制PQ的细胞摄取,在细胞内部CB[7]亦有可能与PQ形成复合物,抑制氧化循环使细胞免受PQ引起的毒性。此项利用小鼠进行的系统的研究说明CB[7]能够作为口服解毒剂用于PQ中毒。CB[7]可以在田野,边远医院,急救室中使用,这样的潜在的拯救生命的方

法,不需要高端设备与复杂技巧,即可能在农村或偏远及发展中国家用于PQ中毒的治疗。

[0168] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

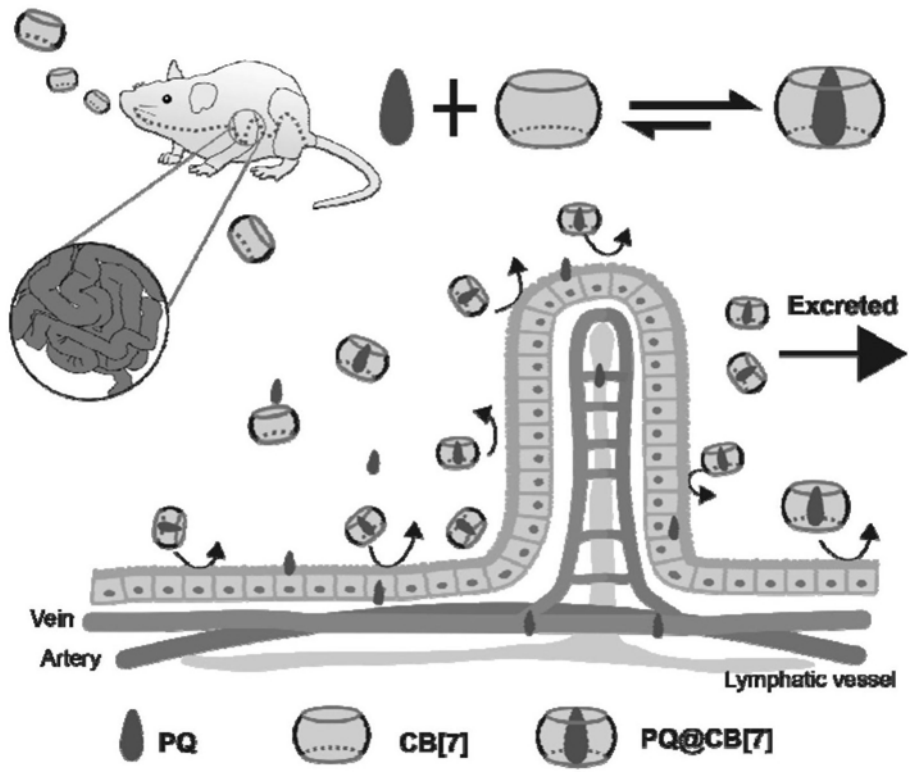


图1

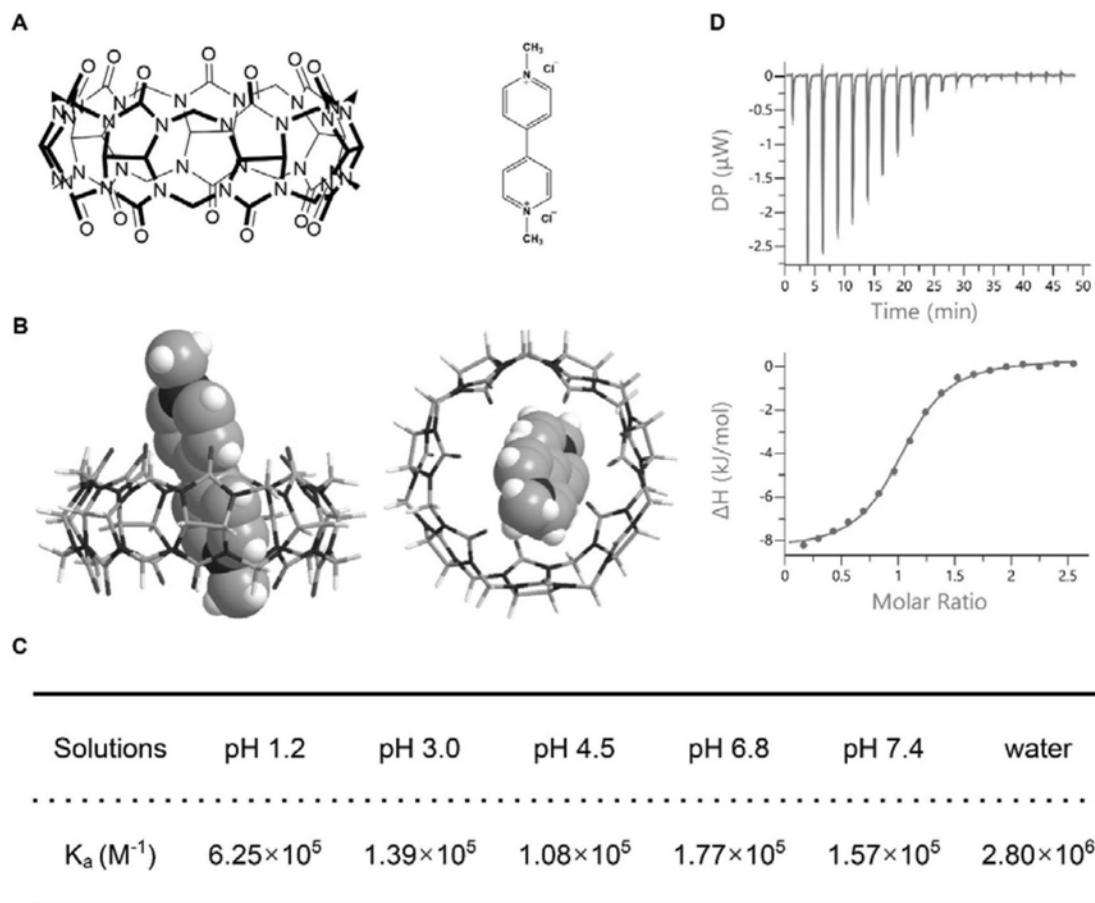


图2

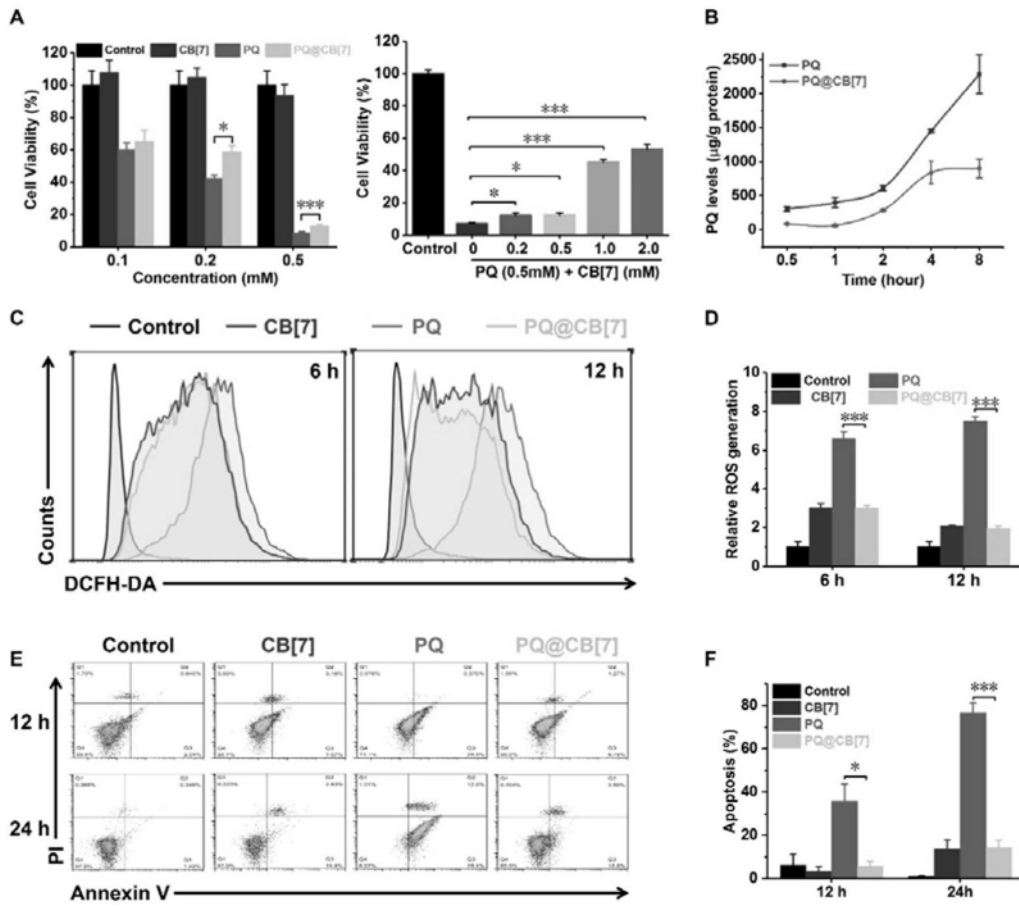


图3

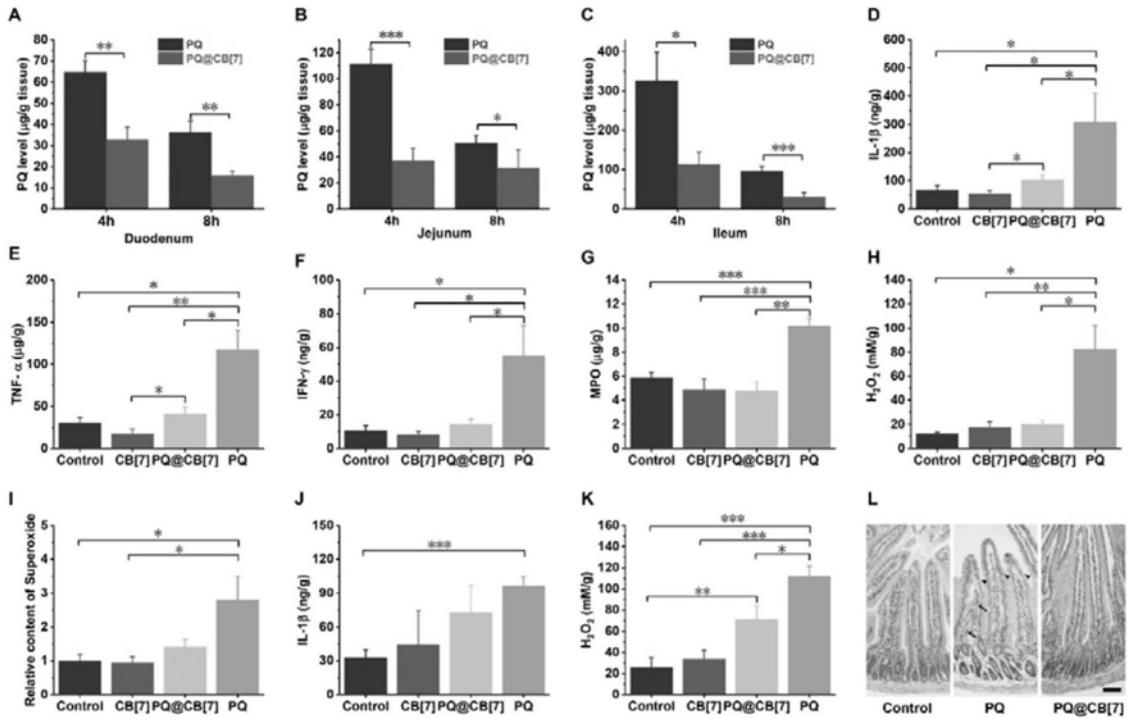


图4

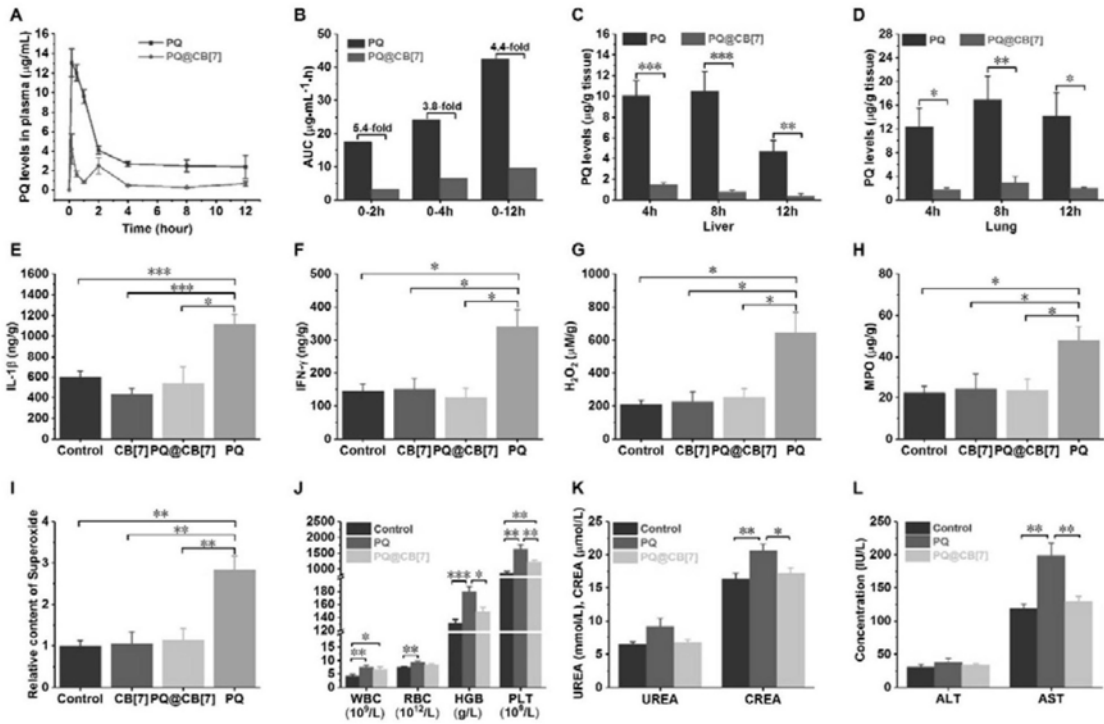


图5

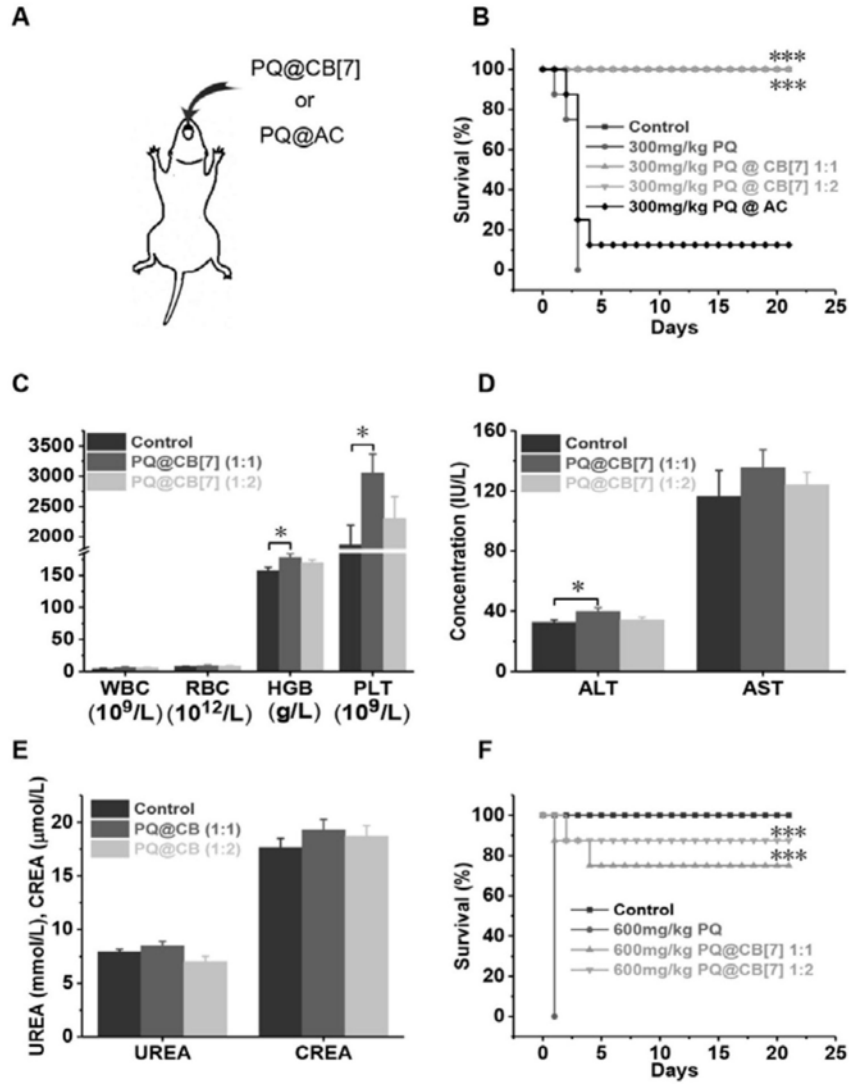


图6

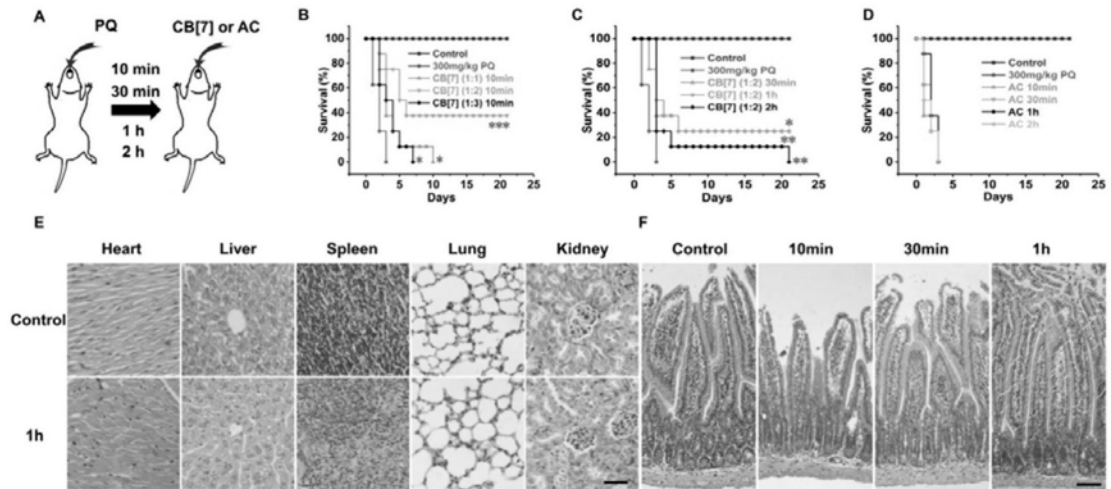


图7

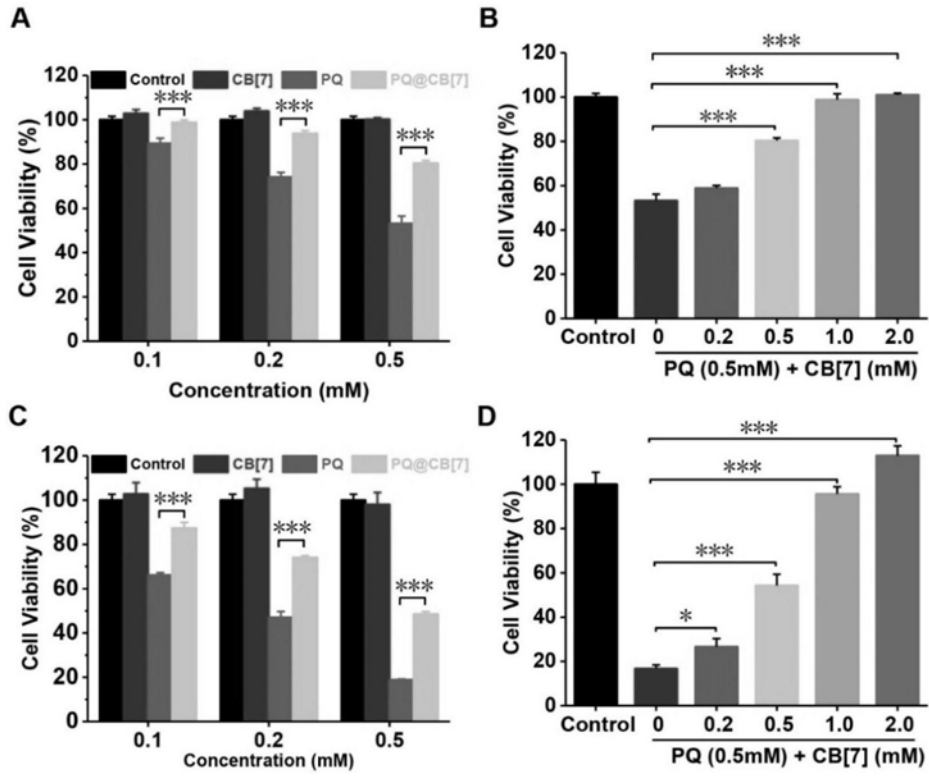


图8

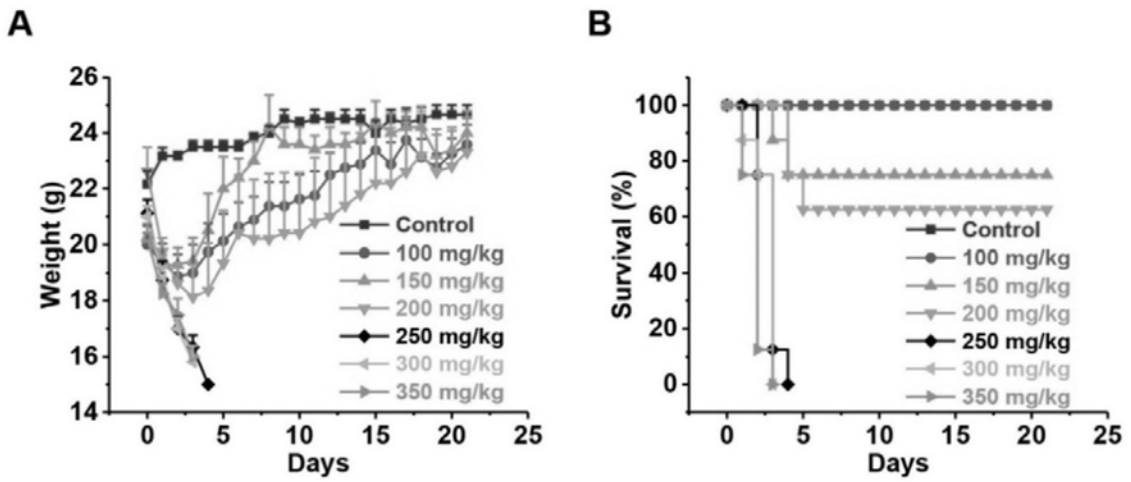


图9

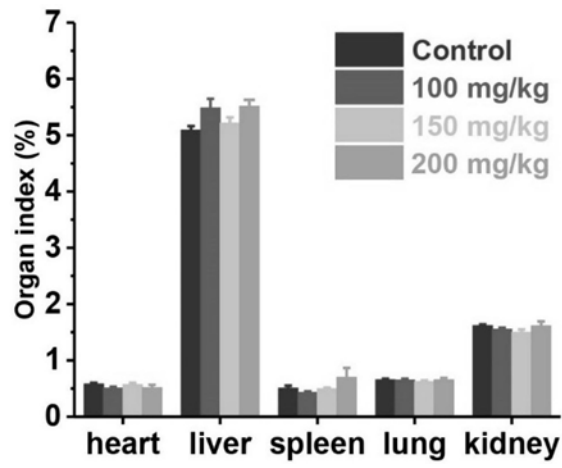


图10

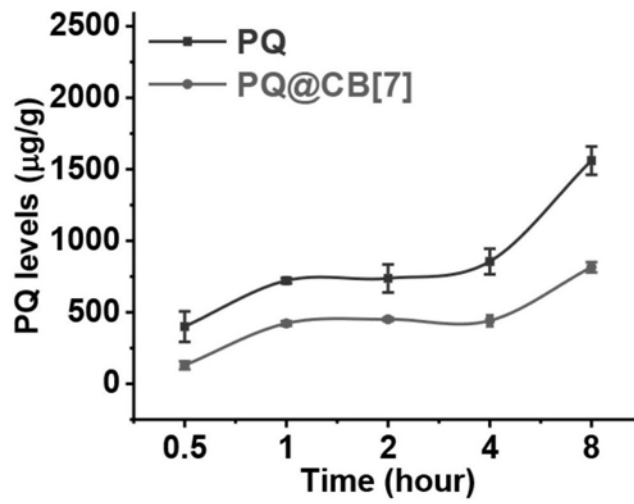


图11

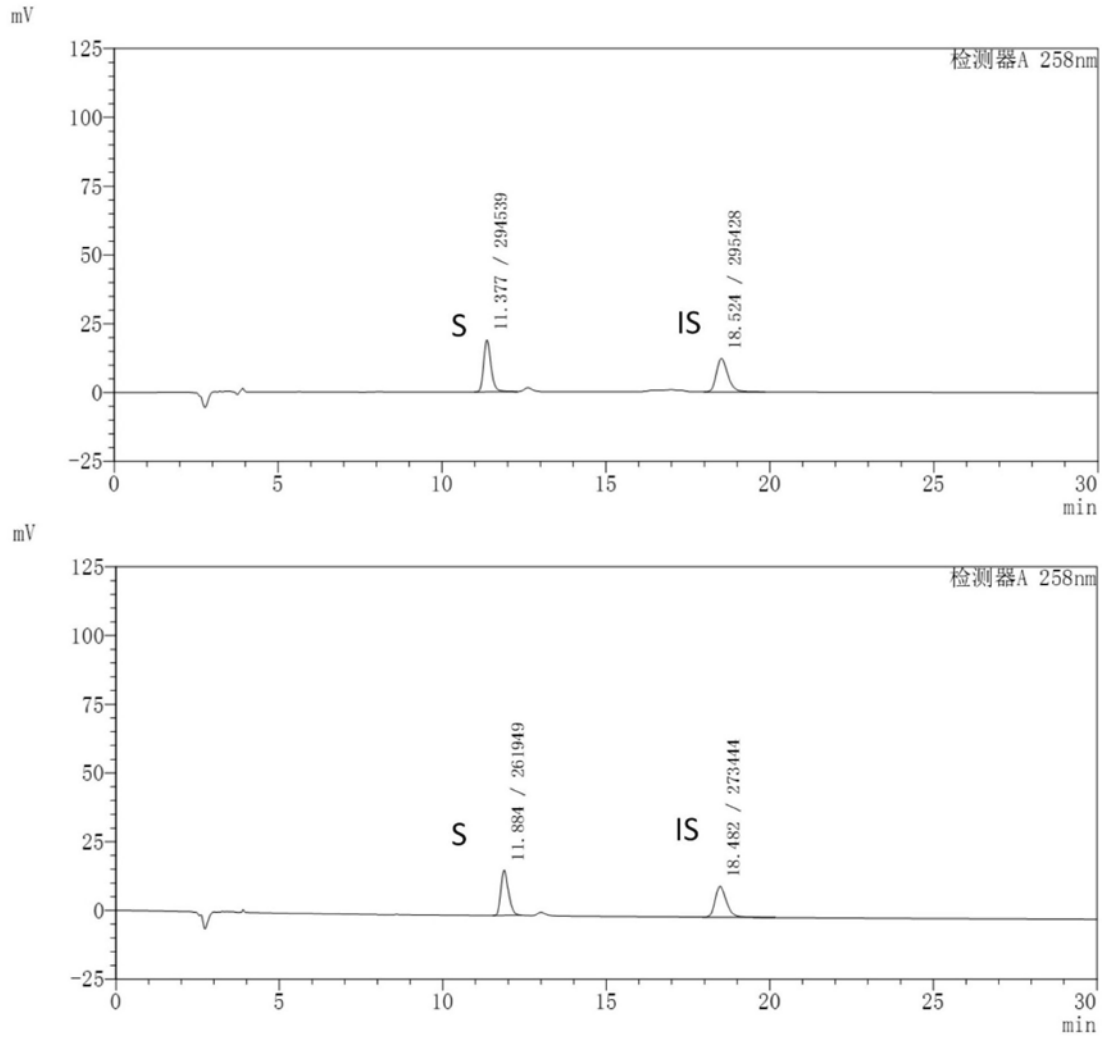


图12

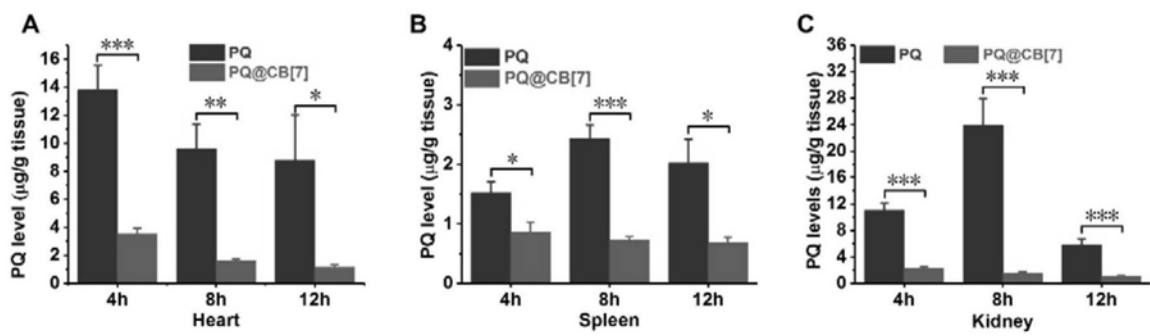


图13

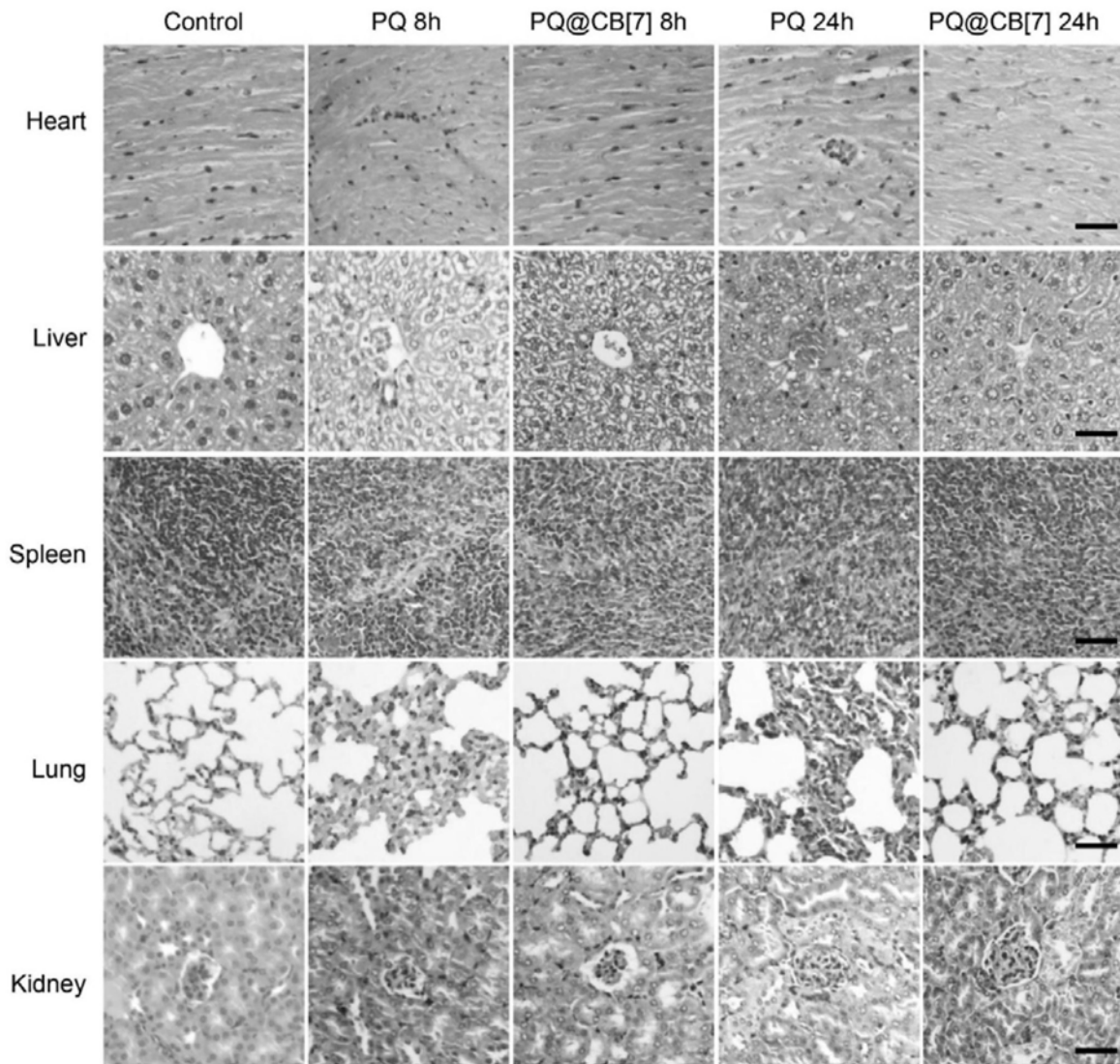


图14

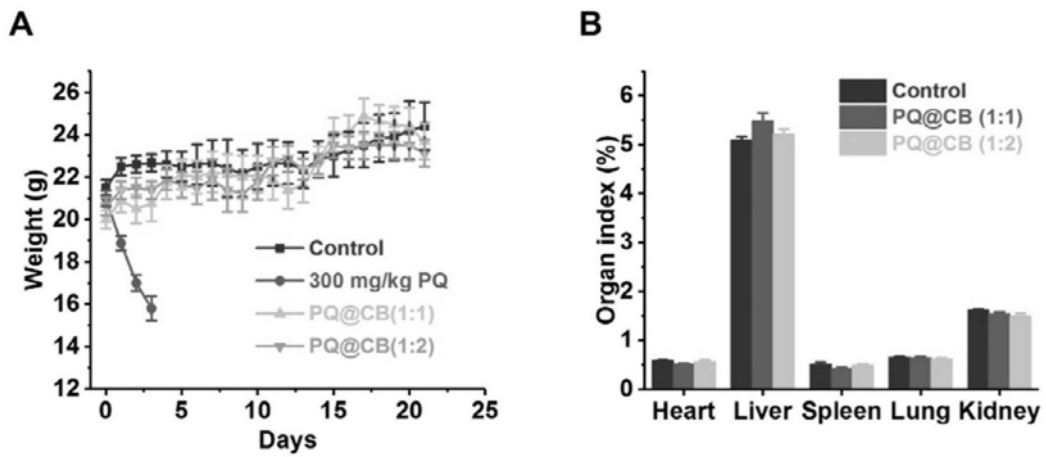


图15

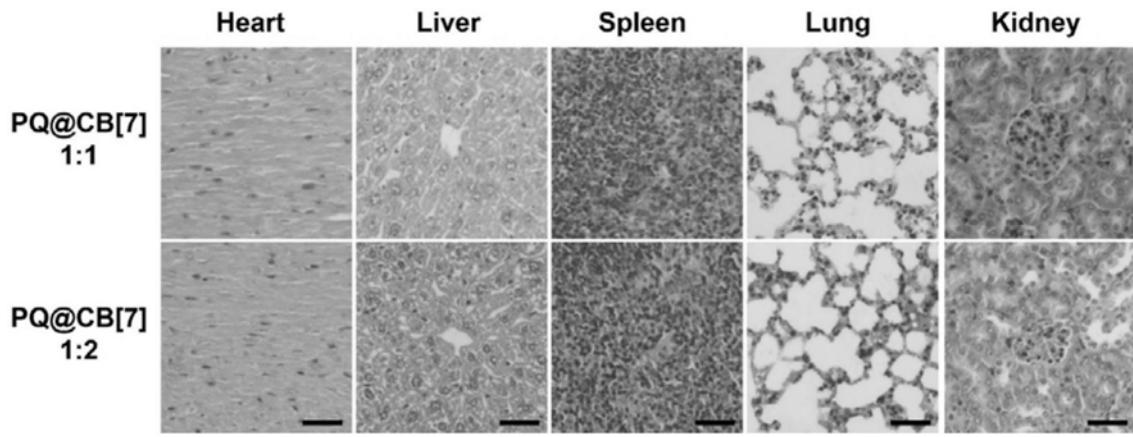


图16

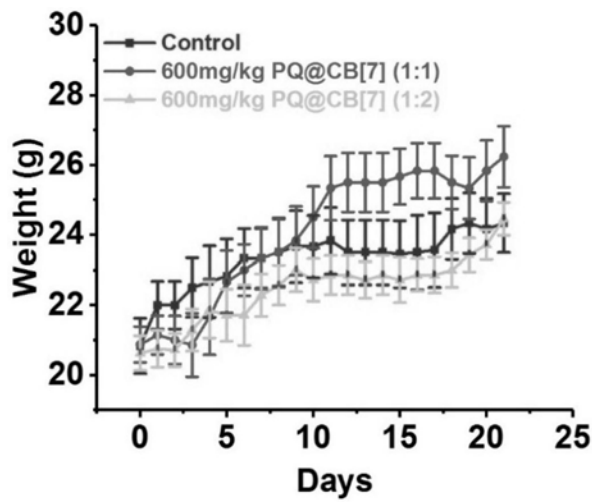


图17

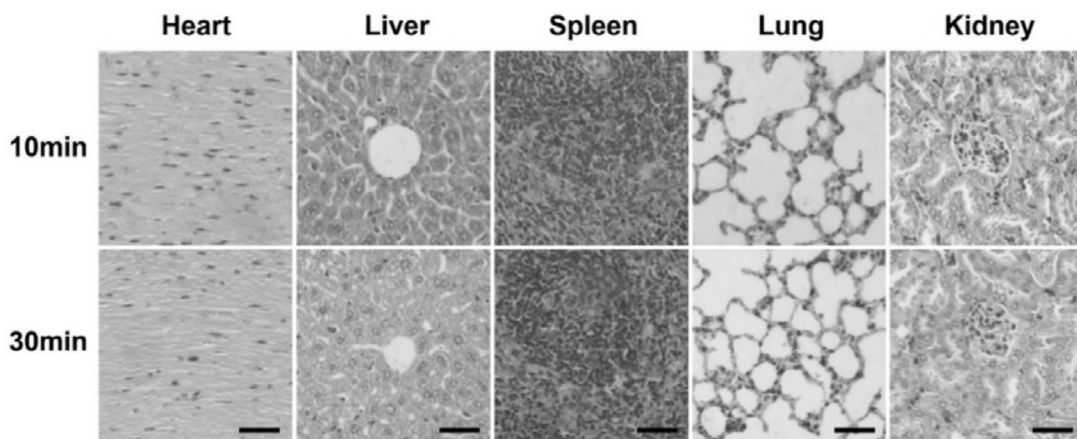


图18

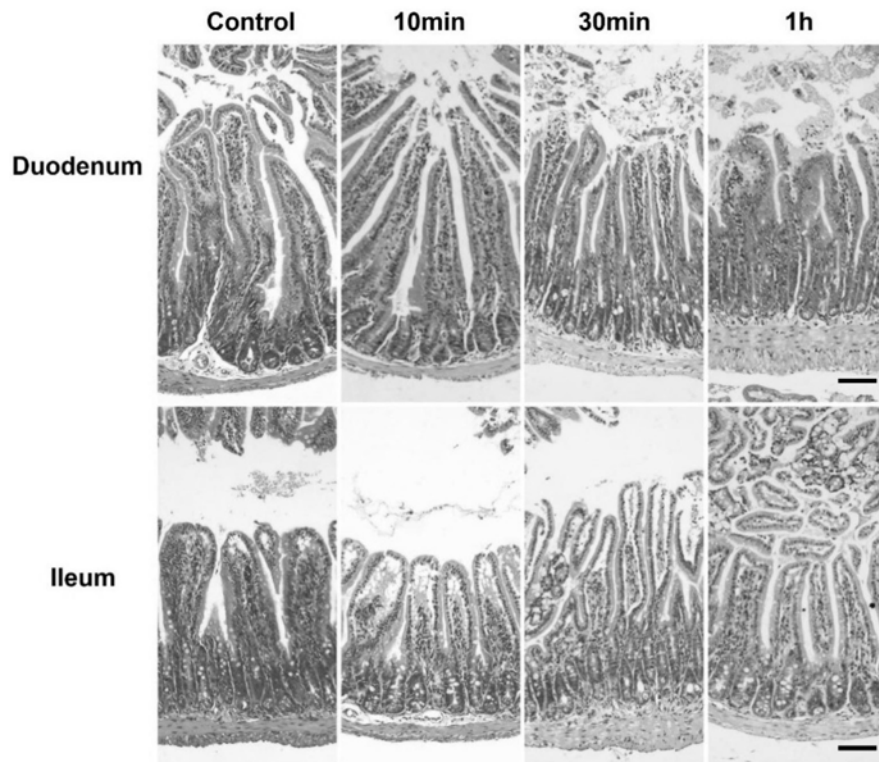


图19