(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2016 年 5 月 19 日 (19.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/074203 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 33/00 (2006.01)	*A61P 25/16* (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)	*A61P 25/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	*A61P 19/10* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)	*A61P 9/00* (2006.01)
A61K 8/20 (2006.01)	*A61Q 19/08* (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01)	*A61Q 19/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/091047

(22) 国际申请日: 2014 年 11 月 13 日 (13.11.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(72) 发明人; 及

(71) 申请人: **刘学武 (LIU, Xuewu)** [CN/CN]; 中国北京市朝阳区望京街合生麒麟社 2 号楼 901 室, Beijing 100102 (CN)。

(81) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2016/074203 A1

(54) Title: CELL APOPTOSIS INDUCER CONTAINING CHLORINE DIOXIDE AND USE THEREOF IN PREPARING COSMETICS OR ANTI-AGING OR ANTINEOPLASTIC DRUGS

(54) 发明名称: 包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂及其在制备化妆品或抗衰老或抗肿瘤药物中的用途

(57) Abstract: The present invention relates to a cell apoptosis inducer containing chlorine dioxide. The present invention relates to a cell apoptosis inducer kit containing the following two independent components: the first component: a chlorine dioxide precursor solid, or a solution containing a chlorine dioxide precursor; and the second component: an auqeous solution of an acidity pH adjuster; the two components are stored separately, and can be mixed before use so that in-situ reaction occurs and the cell apoptosis inducer containing chlorine dioxide is prepared; and the amounts and concentrations of the first component and the second component enable the pH of the mixed solution to be 1.5-6.5. The present invention further relates to use of the cell apoptosis inducer containing chlorine dioxide or the cell apoptosis inducer kit containing chlorine dioxide in preparing drugs for treating tumors, or use thereof in preparing anti-aging drugs for target tissues of mammals, or use thereof as cosmetics, or use thereof in preparing chemotherapeutic drugs.

(57) 摘要: 涉及一种包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂。涉及一种细胞凋亡诱导剂试剂盒，其包含以下两种独立的组分：第一组分：二氧化氯前体固体，或包含二氧化氯前体的溶液；第二组分：酸性 pH 调节剂的水溶液；二者分开存放，且能在使用前进行混合，以现场反应并制得包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂；且第一组分和第二组分的量和浓度能够使得混合后的溶液的 pH=1.5-6.5。还涉及包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂或包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒用于制备治疗肿瘤的药物的用途，或者用于制备哺乳动物目标组织抗衰老药物的用途，或者用作化妆品的用途，或者用于制备化疗药物的用途。

包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂及其在制备化妆品或抗衰老或抗肿瘤药物中的用途

技术领域

本发明属于抗衰老和肿瘤治疗领域，具体涉及通过诱导衰老细胞和肿瘤细胞发生凋亡，从而抗衰老和治疗肿瘤的方法，以及二氧化氯在制备用于哺乳动物细胞凋亡诱导剂的化妆品或药物的应用。

背景技术

机体的衰老不能等同于细胞的衰老，但是前者是后者累计的结果，因此机体衰老一定程度上可以用衰老细胞的百分比来刻画。机体内总有细胞在不断地衰老与死亡，同时又有细胞增殖产生新生细胞进行补偿。如果细胞增殖产生的新生细胞不仅全部补充死亡的细胞，而且能够将部分的衰老细胞替换，那么机体就表现的更为年轻。有研究表明：终身清除衰老细胞，能够延迟与年龄相关的表现型的最初出现时间。而且，晚年的清除会延缓已经出现的与年龄相关的病症的发展。这表明，衰老细胞的确能引起与年龄相关的表现型，而且它们的清除能够防止或延迟与年龄相关的组织功能丧失（Baker DJ, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature, 2011, 479: 232-236）。可以说，清除衰老细胞，降低衰老细胞的比例，机体就能表现的更为年轻，并且可以防止或者延迟与年龄相关的组织功能丧失。衰老细胞的死亡实质上就是细胞凋亡。（惠宏襄等，《自由基与细胞凋亡》，《生物化学与生物物理进展》，1996；23：12）。

衰老并不意味着濒临死亡，如果定期更换培养液，衰老细胞仍可长期生存（Seshadri T, Campisi J. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. Science, 1990 Jan 12;247(4939):205-9）。但衰老细胞的增殖抑制是不可逆的，其生长停滞在细胞周期 G1 期，不能再进入 S 期。这提示衰老细胞可能比增殖活跃的年轻细胞抗凋亡，从而长期维持生存（黄英、张宗玉　童坦君，《人衰老成纤维细胞凋亡的可诱导性》，《中华老年医学杂志》，2000 年 6 月第 19 卷第 3 期）。

因此在理论上找到了一种抗衰老的思路，即通过对衰老细胞的凋亡诱导，促使衰老细胞发生凋亡，走向死亡，从而得以从机体上清除出去。机体会自动启动干细胞再生能力，再生出新的细胞以代替被清除的细胞，使该机体年轻化。

有意识的诱导衰老细胞发生凋亡，是清除衰老细胞最适宜的思路。在胚胎发育阶段通过细胞凋亡清除多余的和已完成使命的细胞，保证了胚胎的正常发育；在成年阶段通过细胞凋亡清除衰老和病变的细胞，保证了机体的健康。比如，在小鼠研究中发现，当把年老的干细胞置于一个年轻的微环境中，它们能够返老还童（Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix Yun Sun, et al. The FASEB Journal, May 2011, vol. 25 no. 5 1474-1485），即年轻化，也表示再生能力更强。从另一个方面理解，组织中衰老细胞得以清除，由于特异性的诱导空间存在，组织中的干细胞会自动再生，再生的组织更为年轻化，因此机体整体表现为年轻化。

有较多研究指出细胞凋亡有助于机体延迟与衰老相关的组织功能丧失。比如，DNA 断裂也是细胞凋亡的标志特征，DNA 双链断裂（ DNA double-strand breaks）在老鼠大脑活动的变化关系表明：这种 DNA 分子的断裂，即使在完全健康的小鼠神经元中也会发生，在适应新环境过程的小鼠大脑中，DNA 断裂的速度是那些待在旧环境中不动小鼠的六倍（Elsa Suberbielle, et al. pHysiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-β Nature Neuroscience 16, 613 - 621 (2013)）。显然适应新环境的小鼠记忆和思维能力更强，这表明 DNA 双链断裂的这种细胞凋亡过程能够促进小鼠的大脑年轻化。

自噬促进了凋亡细胞最终的降解，也是衰老细胞清理的最后一步。自噬增多具有抗衰老效应（Louis R. Lapierre，et al. The TFEB orthologue HLH-30 regulates autopHagy and modulates longevity in Caenorhabditis elegans，Nature Communications. 4, Article number:2267）。能引起细胞氧化的因素均能引起细胞凋亡。通过对巨噬细胞和单核细胞的研究，Albina 等提出 NO 也是细胞凋亡的诱导剂（ Albina JE，Cui S,Mateo RB et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macropHages.J Immunol, 1993 Jun 1;150(11):5080-5）。

一氧化氮（NO）对诸多衰老性疾病有治疗作用，比如，，一氧化氮具有防止导致帕金森氏症的神经细胞异常的作用，这其中一氧化氮促进了废弃蛋白质的分解，起到了保护神经细胞的作用（Kentaro Ozawa，et al. S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin Scientific Reports 3,Article number:2202 （ July 2013）。一氧化氮的这种缓解衰老性疾病的机理似乎就是促进衰老细胞发生凋亡。

但是现实中却没有发现如何安全方便地靶向清除衰老细胞，而使机体年轻化的技术。

申请号为 201110102598.1 的中国专利《紫檀提取物与一氧化氮相结合的护肤品》提到：一氧化氮本身对皮肤的促进再生、抵抗衰老的良好功效，还能增加皮肤对传统化妆品有效成分的吸收。

申请号为 201210499300.X 的专利《一种启动哺乳动物干细胞的方法及二氧化氯在制备用于启动哺乳动物干细胞的药物的应用》，有使用二氧化氯用于启动干细胞从而促进再生，但是没有提及如何通过清除衰老细胞使组织年轻化的机理，也没有可用于药物或化妆品中的抗衰老应用。尽管该专利依据干细胞再生机理提到二氧化氯治疗一些老年性疾病，但是并没有在预防这些疾病方面给出更多方案。

癌症和衰老的根源是一样的（Carlos López-Otín, et al. The Hallmarks of Aging. Cell, 6 June 2013）。诱导肿瘤细胞凋亡已经成为治疗肿瘤的一个重要途径。如果将肿瘤细胞看作衰老细胞，那么通过诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗肿瘤的思路和通过诱导衰老细胞凋亡来抗衰老的思路是一致的。

肿瘤细胞通常具有一定的凋亡抵抗机制，利用细胞凋亡机制针对肿瘤的治疗也就是在凋亡调节的各个水平上使促凋亡和抗凋亡的平衡发生改变，诱导肿瘤细胞凋亡。

尽管有关凋亡机制的研究在近十多年得到了很大的进展，但能够确切详尽解释细胞凋亡，尤其是哺乳动物细胞凋亡的机制并不多，目前普遍接受的经典途径有以下两条：死亡受体途径和线粒体途径。

针对肿瘤细胞特殊的 pH 环境，有研究表明，碳酸氢钠增加了肿瘤 pH 值抑制了自发肿瘤转移（Ian F. Robey，et al. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases Cancer Res March 15, 2009 69;2260 ），但是其对肿瘤细胞本身并未形成凋亡诱导。

现有的肿瘤细胞凋亡诱导剂有如下几个缺点：靶向性不明确、副作用大、治疗手段复杂且不确定性高、会引起肿瘤细胞的抵抗、只对少数类型肿瘤细胞有效。

如果诱导肿瘤细胞发生凋亡是治疗肿瘤的正确思路，那么需要寻找更具靶向性，更低毒副作用，更具有普适性的细胞凋亡诱导剂。

二氧化氯是目前国际上公认的新一代的高效、广谱、安全的杀菌、保鲜剂，是氯制剂最理想的替代品，在世界发达国家已得到广泛的应用。美国、西欧、加拿大、日本等发达国家的有关组织如美国环境保护局、食品药品管理局、美国农业部均批准和推荐二氧化氯用于食品、食品加工、制药、医院、公共环境等的消毒、防霉和食品的防腐保鲜等。世界卫生组织

（WHO）和世界粮食组织(FAO)也已将二氧化氯列为A1级安全高效消毒剂。为控制饮水中“三致物质”（致癌、致畸、致突变）的产生，欧美发达国家已广泛应用二氧化氯替代氯气进行饮用水的消毒。但二氧化氯作为药品还未被市场所接受。然而，有部分专利涉及到利用二氧化氯用于美容或治疗疾病的用途（例如，CN102137651A、CN101641104A 和 CN1199633C、US5750108、CN102441006A），这些专利仍未发现二氧化氯，或者含有二氧化氯的酸性溶液具有清除衰老细胞的潜力。

发明概述

第一方面，本发明涉及一种包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂。

在一种优先的实施方案中，该细胞凋亡诱导剂，包含溶解在水中的二氧化氯，其中二氧化氯浓度为500-2900ppm，基于质量计算。

在一种更优选的实施方案中，本发明的细胞凋亡诱导剂还含有酸性pH调节剂，使得该细胞凋亡诱导剂的pH=1.5-6.5，所述酸性pH调节剂选自以下各集合中的至少一种：

有机酸或其盐，其选自由甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸、乙醇酸、富马酸、丙二酸、马来酸、草酸、琥珀酸、丙烯酸、巴豆酸、戊二酸和它们的盐组成的集合；

无机酸或其盐，其选自由盐酸、磷酸、硼酸、偏磷酸、焦磷酸、氨基磺酸、磷酸二氢盐、磷酸氢盐组成的集合。

最优选地，其中所述酸性pH调节剂选自柠檬酸、乙酸或磷酸二氢盐。

第二方面，本发明涉及一种包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒，其包含以下两种独立的组分：

第一组分：二氧化氯前体固体，或包含二氧化氯前体的溶液；

第二组分：酸性pH调节剂的水溶液；

二者分开存放，且能在使用前进行混合，以现场反应并制得包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂；且第一组分和第二组分的量和浓度能够使得混合后的溶液的pH=1.5-6.5；

其中所述二氧化氯前体选自亚氯酸钠、亚氯酸钾、亚氯酸锂、亚氯酸钙、亚氯酸镁或亚氯酸钡中的至少一种；

其中所述酸性pH调节剂选自以下各集合中的至少一种：

有机酸或其盐，其选自由甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、

酒石酸、葡糖酸、乙醇酸、富马酸、丙二酸、马来酸、草酸、琥珀酸、丙烯酸、巴豆酸、戊二酸和它们的盐组成的集合；

无机酸或其盐，其选自由盐酸、磷酸、硼酸、偏磷酸、焦磷酸、氨基磺酸、磷酸二氢盐、磷酸氢盐组成的集合。

第三方面，本发明涉及上述包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂或上述包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒用于制备诱导细胞凋亡的药物的用途。优选地，所述细胞为哺乳动物的细胞。

第四方面，本发明涉及上述包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂或上述包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒用于制备治疗肿瘤的药物的用途，或者用于制备哺乳动物目标组织抗衰老药物的用途，或者用作化妆品的用途，或者用于制备化疗药物的用途。

发明详述

在对现有技术研究的基础上，本发明的一个目的是提供二氧化氯在制备用于哺乳动物细胞凋亡诱导剂的药物或化妆品的应用。根据该应用，用于抗衰老的药物或化妆品中有含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂，该药物或化妆品能够清除目标组织中的衰老细胞，促进身体的再生，再生年轻的组织，以达到抗衰老的作用。该应用具有很小的副作用或者无副作用。

本发明的另一个目的是提供二氧化氯在制备用于哺乳动物细胞凋亡诱导剂的药物的应用。根据该应用，用于促进哺乳动物肿瘤细胞凋亡的药物中有含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂，该药物能够靶向明确的诱导肿瘤细胞发生凋亡，达到更好的肿瘤治疗效果，且具有很小的副作用或者无副作用，对患者的负担较轻。

为达到以上目的，本发明采用的技术方案是：制备含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂以及对哺乳动物目标组织给予所述细胞凋亡诱导剂的步骤，其中所述细胞凋亡诱导剂被给予哺乳动物目标组织时提供有效量的二氧化氯。

进一步，制备含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂的方法为：将二氧化氯气体溶于含酸性 pH 调节剂的 pH 值为 1.5～6.5 的酸性溶液 A 中，制备 500～2900ppm 的二氧化氯溶液。

进一步，制备含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂的方法为：将二氧化氯前体溶解于水中制备成 1%～40%的水溶液，向该水溶液中加入含有酸性 pH 调节剂的酸性溶液 B，调节混合溶液的 pH 值为 1.5～6.5。

进一步，制备含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒的方法为：将二氧化氯前体溶解于水中，制成浓度为 1%～40%的水溶液 C；将酸性 pH 调节剂溶于水中制备出酸性溶液 D；使用前

混合溶液 C、D，调节混合溶液的 pH 值为 1.5～6.5。

再进一步，二氧化氯前体为亚氯酸钠、亚氯酸钾、亚氯酸锂、亚氯酸钙、亚氯酸镁和亚氯酸钡。

再进一步，酸性 pH 调节剂为柠檬酸、乙酸或磷酸二氢钠。

进一步，细胞凋亡诱导剂通过动脉注射、肌肉注射、皮下注射、心内注射、鞘内注射、关节内注射、穿刺注射、直肠给药、鼻腔给药、经皮给药或吸入给药的方式直接给到损伤的器官或组织或给到其它目标组织中。

进一步，可将细胞凋亡诱导剂制成注射剂、软膏剂、吸入剂、滴鼻剂、洗剂、栓剂、贴剂、糊剂、片剂、口服液、胶囊剂、颗粒剂、冲剂、丸剂或糖浆剂。

本发明提供了二氧化氯在制备用于二氧化氯在制备用于哺乳动物细胞凋亡诱导剂的药物、化妆品的应用，其中，该药物或化妆品用于哺乳动物目标组织的抗衰老，使其年轻化。

进一步，这种抗衰老包括，皮肤年轻化即皮肤美容，身体其他组织年轻化，比如增加记忆力、提高睡眠治疗、预防阿尔兹海默症、帕金森综合症、骨质疏松、糖尿病、心脑血管疾病等老年性疾病等，包括但不限于这些。

更进一步，二氧化氯在制备用于哺乳动物细胞凋亡诱导剂的药物、化妆品的应用，其中，该药物用于人体组织抗衰老，并预防阿尔兹海默症、帕金森综合症、骨质疏松、糖尿病、心脑血管疾病等老年性疾病等；该化妆品用于皮肤美容护肤、祛痘或去除痤疮，也可以用于口腔护理的漱口水，包括但不限于这些。

本发明还提供了二氧化氯在制备用于诱导哺乳动物细胞凋亡的药物中的应用，其中，该药物用于治疗癌症，具体为诱导哺乳动物肿瘤细胞凋亡。

进一步，通过诱导肿瘤细胞凋亡，其中针对的癌症包括：

颅内转移瘤、脑膜瘤、颅骨肿瘤、脑癌、脑垂体腺瘤、听神经鞘瘤、神经胶质瘤、脑肿瘤；上颌窦癌、喉癌、鼻咽癌、舌癌、甲状腺癌、牙龈癌、唇癌；胸腺瘤、肺癌、腺癌、乳房肉瘤、肺转移瘤、乳房纤维瘤、乳腺癌； 胰头癌、胃癌、胆囊癌、直肠癌、胰腺癌、食管癌、结肠癌、肝癌；肾盂肿瘤、阴茎癌、尿路上皮癌、前列腺癌、尿道癌、睾丸癌、膀胱癌、肾母细胞瘤、肾癌；卵巢癌、输卵管肿瘤、外阴癌、阴道肿瘤、子宫癌、宫颈癌、绒毛膜癌、盆腔癌；皮肤癌、脂肪肉瘤、恶性畸胎瘤、纤维瘤、神经纤维瘤、黑色素瘤、胆管癌、鳞癌、基底细胞癌；脊索瘤、骨瘤、软骨瘤、骨肉瘤、滑膜肉瘤、骨巨细胞瘤、骨纤维肉瘤；急性白血病、恶性淋巴瘤、慢性白血病；肝血管瘤、胰岛细胞类癌、母细胞瘤、粘液瘤、颈部转移癌、贲门癌。包括但不限于这些癌症。

进一步，本发明的二氧化氯在制备用于诱导哺乳动物细胞凋亡的药物中的应用，该应用中的药物可投予存在发展癌症的风险、经诊断患有癌症、处于癌症治疗期间或处于癌症治疗后恢复期间的受检者个体，或该药物可作为预防剂投予受检者个体以阻止或延缓癌症的发展。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明作进一步描述。

本发明将细胞凋亡定义为细胞的死亡、并被降解清除，而不严格区分是否属于凋亡（apoptosis）、坏死（necrosis）或自噬（autophagy）。本发明中的诱导衰老细胞和肿瘤细胞凋亡就是指促使衰老细胞死亡、并被降解清除和肿瘤细胞死亡、并被降解清除，而并不细究死亡的方式和过程。

在描述本发明的具体实施方式之前，首先对本发明所提供方法的机理进行描述。这些描述再结合具体实施例将有助于本领域技术人员理解本发明的技术方案和保护范围。

有研究表明：终身清除衰老细胞，能够延迟与年龄相关的表现型的最初出现时间。而且，晚年的清除会延缓已经出现的与年龄相关的病症的发展。这表明，衰老细胞的确能引起与年龄相关的表现型，而且它们的清除能够防止或延迟与年龄相关的组织功能丧失。(Baker DJ, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature, 2011, 479: 232-236)。可以说，清除衰老细胞，降低衰老细胞的比例，机体就能表现的更为年轻，并且可以防止或者延迟与年龄相关的组织功能丧失。衰老细胞的死亡实质上就是细胞凋亡。(惠宏襄等，《自由基与细胞凋亡》.《生物化学与生物物理进展》，1996；23：12)。

自噬促进凋亡细胞的降解，所以也能起到衰老细胞清除的作用。研究发现，果蝇的记忆缺失能够通过食用富含多胺的食物扭转过来。喂果蝇等吃多胺能够增强生物体的寿命。它似乎通过逆转与年龄相关的自噬的衰退来起作用。自吞噬是指细胞用来清除自身残片的机制。通过基因技术或限制卡路里摄入提高自吞噬，也能够延长果蝇的寿命。(Varun K Gupta, et al. Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autopHagy-dependent manner. Nature Neuroscience, 01 September 2013)。

高水平的 ROS 可诱导细胞凋亡（Lau AT, Wang Y, Chiu JF. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. J Cell Biochem. 2008 May 15;104(2):657-67)。研究显示当线虫以生产一氧化氮的细菌为食时，寿命得到显著延长（Ivan Gusarov, et al. Bacterial Nitric Oxide Extends the Lifespan

of C. elegans Cell, Volume 152, Issue 4, 818-830, 14 February 2013)。这说明氧化物可以促进细胞发生凋亡。

尽管抗氧化作为抗衰老的有效标准一直存在，但是现实证据却很少支持。如果无法及时清除缺陷型的蛋白，就会导致蛋白内稳态的丧失，引发衰老相关疾病。例如在阿尔茨海默症中，无法清除的蛋白形成斑块，导致神经元死亡。虽然大量的自由基可能有害，但它们的存在也会触发保护性的应答。没有任何遗传学证据能说明，增强机体的抗氧化防御能够延缓衰老。(Carlos López-Otín, et al.The Hallmarks of Aging. Cell, 6 June 2013)。

在一些实施例中，本发明也证明了具有较强氧化性物质（二氧化氯）可以促进细胞发生凋亡，并且有助于机体的年轻化。

另一方面，在生长因子依赖的细胞株凋亡过程中普遍存在细胞内酸化，细胞内酸化是细胞凋亡过程中的一种细胞内信号变化，它促进细胞凋亡已有以下几方面的事实所支持:①特异性 Na^+/H^+ 交换抑制剂通过抑制 Na^+/H^+交换体使细胞内酸化可诱导凋亡，除 Na^+/H^+交换器外，Na^+-HCO_3^- 协同运输器与 Cl^-/ HCO_3^-交换器的改变也与细胞凋亡关系密切，细胞浆酸化程度与细胞凋亡发生率存在量效关系;②单纯的碱处理通过减少胞内酸化程度而表现出对抗诱导剂诱导的细胞凋亡;③细胞内存在酸性核酸内切酶，细胞内酸化能激活该酶，触发核小体 DNA 裂解，该酶是细胞酸化介导细胞凋亡的一个重要物质基础;④许多与细胞凋亡有关的酶和蛋白质的活性在酸性环境中增强（边肖海等，《胞内 pH 值在细胞凋亡中的研究进展》，《长治医学院学报》2004 年 4 期)。

衰老或者凋亡细胞在酸性的条件下更容易走向死亡。凋亡细胞糖酵解作用加强，酸性代谢产物增多，如果外部施加酸压力（降低 pH 值)，凋亡细胞将加速走向死亡。比如，心肌肥大是心肌组织对负荷增加的一种防御性反应，以暂时适应总体或局部心肌应力的改变，如果心脏生理机能的需要超过心肌细胞的代偿适应能力，心肌细胞将发生自杀性死亡即细胞凋亡，成为心肌肥大向心力衰竭转化的主要机制之一。在缺氧时，肥大心肌细胞糖酵解率仅轻度下降，但在复氧后糖酵解率迅速升高，呈爆发样达峰值后又逐渐恢复到缺氧前水平。糖酵解率的升高必然引起细胞内乳酸酸中毒。常氧培养时肥大心肌细胞凋亡率即显著高于正常心肌细胞，二者在缺氧后的细胞凋亡均显著增加，复氧后正常心肌细胞凋亡逐渐减少，而肥大心肌细胞在复氧早期细胞凋亡率继续大幅度上升，此后逐渐减少。(冯兵，刘伟，徐静，何作云，杨惠标，《缺氧复氧时肥大心肌细胞凋亡及其与能量代谢途径转换的关系》，Acta pHysiologica Sinica, October 25, 2005, 57(5): 636-642)

肌酸（creatine）在生物化学中，是一种自然存在于脊椎动物体内的一种含氮的有机酸，

能够辅助为肌肉和神经细胞提供能量。研究发现，口服肌酸能够改善 G93A 转基因小鼠（肌萎缩性脊髓侧索硬化症）机体性能，并延长寿命，该种作用呈现量效关系，同时还保护小鼠运动神经元和黑质神经元的损伤（Klivenyi P, et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotropHic lateral sclerosis.. Nature Medicine. 1999.mar, 5 (3): 347 - 350）。研究也发现硫辛酸（lipoic acid）能够减缓衰老过程。

普遍认为 L-抗坏血酸的抗衰老作用在于其抗氧化能力。但是，2009 年，由德国耶拿大学的迈克尔·瑞斯托实验室进行的重要实验表明 ROS 对于维持肝脏的基本功能必不可少。实验结果表明，体育锻炼通过提高来自线粒体（细胞内产能的微小器官，产能原理部分经由氧化还原链）内的电子传递链体系 ROS 的产生，阻止 II 型糖尿病的发生。然而如果同时每天服用抗氧化剂维生素 C 和维生素 E，锻炼就没有积极的效果。2009 年 2 月出版的《临床营养》就发表了一篇综述，总结了总参与人数多达十几万的 22 项公开发表的随机双盲对照研究，结论是没有支持“抗氧化剂防止冠状动脉硬化”的说法。而《美国医学会杂志》2007 年 2 月发表的一篇综述更加打击抗氧化剂保健品。对总共涉及 23 万多人的 68 项研究进行总结，分析的几种抗氧化剂对于死亡率没有影响。如果剔除那些质量不高的研究，只对 47 项总计超过 18 万人参与的高质量研究进行分析，那么这几种抗氧化剂甚至小幅度增加了死亡率。因此，本发明人认为，L-抗坏血酸的抗衰老作用在于其酸性。

多种酸性物质有美容的作用。比如，以 30%高浓度的水杨酸作为化学换肤的药剂，可达到和 70%果酸换肤相同的淡化色素斑、缩小毛孔、去除细小皱纹及改善日晒引起的老化等多项效果。皮肤美容就是让皮肤年轻化，所以大致可以得出结论，酸性物质能够清除衰老细胞，促进年轻皮肤再生。中剂量和高剂量柠檬酸处理组引起了小鼠睾丸组织细胞的凋亡（王艳杰：柠檬酸对小鼠睾丸组织凋亡的影响[D];河南科技大学：2012 年）。

发明人猜想，L-抗坏血酸，肌酸，硫辛酸等酸性物质能够抗衰老的作用，更多的是因为其酸性特征能够加速衰老细胞发生凋亡，从而引起机体年轻化。发明人意外的发现，用有较高氧化电位的二氧化氯液剂并辅以酸性环境能够抗衰老。

在一些实施例中，本发明通过试验证明了，酸性环境有助于提高二氧化氯制剂对细胞的凋亡作用。

在本发明的多个实施例中，我们采用酸性二氧化氯溶液靶向给予目标组织，证明可以使目标组织年轻化。

肿瘤细胞有十大特征：自给自足生长信号（Self-Sufficiency in Growth Signals）；抗生长信号的不敏感（Insensitivity to Antigrowth Signals）；抵抗细胞死亡(Resisting Cell

Death)；潜力无限的复制能力(Limitless Replicative Potential)；持续的血管生成(Sustained Angiogenesis)；组织浸润和转移(Tissue Invasion and Metastasis)；避免免疫摧毁(Avoiding Immune Destruction)；促进肿瘤的炎症（Tumor Promotion Inflammation)；细胞能量异常（Deregulating Cellular Energetics)；基因组不稳定和突变（Genome Instability and Mutation)。Hanahan D, Weinberg RA.Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74)。如果抑制其抵抗细胞死亡，也就是诱导肿瘤细胞凋亡，很大程度抑制了癌症的发生。从逻辑上考虑，由于肿瘤细胞是非正常细胞，机体自身天生应该对其有抑制作用，也就是这些细胞应该自动发生凋亡，之所以不发生凋亡与其自身特征有关。研究发现，一些癌症或许不能完全归因为遗传损伤，而是衰老细胞绕过了告诉它们停止生长的开关所引起，衰老细胞与癌细胞之间的行为存在相似之处表明，如果衰老细胞设法逃脱死亡，它们有潜力变为癌症（Hazel A. Cruickshanks, et al. Senescent cells harbour features of the cancer epigenome, Nature Cell Biology (2013))。新的观点认为，癌症和衰老的根源是一样的（Carlos López-Otín, et al.The Hallmarks of Aging. Cell, 6 June 2013)。发明人将肿瘤细胞看作衰老细胞，它理应走向凋亡。因此发明人认为，肿瘤细胞是因为具有的一些特殊能力让其不走向凋亡，而长期滞留在机体内。

针对肿瘤细胞的两个特征也许是消灭肿瘤的最佳方式。该两个特征就是，抵抗细胞死亡和细胞能量异常。参考诱导衰老细胞发生凋亡的思路同样适用于肿瘤细胞。尽管肿瘤细胞有自身的特征，一般癌症病人存在是由于肿瘤细胞不在机体环境作用下自动走向死亡，但是相对于正常的细胞，肿瘤细胞本身发生了变化，比如更怕氧化物，也更怕酸性环境。

通过口服西地那非治疗 3 例患有囊状淋巴管瘤的儿童，通过用药，3 位患儿的肿瘤体积均出现明显的缩小（Glenda L. et al. Swetman, Sildenafil for Severe LympHatic Malformations N Engl J Med 2012; 366:384-386 January 26, 2012)。西地那非是 5-磷酸二酯酶抑制剂，磷酸二酯酶是 NO-cGMP 通路的负调节因子，因此西地那非能够通过释放生物活性物质一氧化氮。因此，本发明人认为一氧化氮这种氧化物起到抑制肿瘤的直接作用。

在针对乳腺和黑素瘤癌细胞的实验中发现，硝酸甘油通过产生一氧化氮可以加强一般化疗药物杀死癌细胞的作用（Barsoum IB, et al. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. Cancer Res. 2011 Dec 15;71(24):7433-41)。促一氧化氮释放的前体药物，诱导乳腺癌癌细胞死亡，同时保留正常乳腺上皮细胞（Vanity McMurtry, et al.JS-K, a nitric oxide-releasing pro-drug, induces breast cancer cell death while sparing normal

mammary epithelial cells, International of journal of oncology, Published online on: Tuesday, January 25, 2011,Pages: 963-971)。普遍认为，高浓度的一氧化氮合酶表达，可以对肿瘤细胞产生抑制其生长的毒性作用（Xu W, et al.The role of nitric oxide in cancer. Cell Res. 2002 Dec;12(5-6):311-20)。

细胞增殖实验显示，400 μmol/L、800 μmol/L、1600 μmol/L 对体外培养的 Hela 细胞有不同程度的细胞毒性，最高达 89.0%。过氧化氢处理后，细胞衰老率和活性氧产生水平随过氧化氢浓度升高而增高，呈现量效关系。 结论：过氧化氢对 Hela 细胞有明显的细胞毒性，还能诱导其衰老和影响活性氧的产生水平。

肿瘤细胞和衰老细胞一样，更多的是依靠低氧的糖酵解方式提供能量。早在 80 多年前就发现肿瘤细胞的糖代谢较正常细胞旺盛，而且即使是在有氧条件下也依赖于糖酵解，该现象称为“Warburg 效应”，其机制与肿瘤细胞的细胞膜上的葡萄糖转运蛋白(Glut) 功能活跃，且己糖激酶活性增强有关。“Warburg 效应”的结果是细胞产生大量糖酵解产物——乳酸。从糖脱下来的大量 H^+不能像有氧氧化那样经过呼吸链氧化为水，大量的 H^+聚集将使细胞内面临 pH（pHi） 酸化和发生凋亡的威胁，而肿瘤细胞增强的泌酸功能使细胞内 pHi 得以维持，但对周围正常的宿主细胞将产生不利影响。肿瘤细胞的“Warburg 效应”使肿瘤细胞比正常细胞产生更多的酸，但对肿瘤细胞 pH 检测发现细胞内 pHi 值较正常细胞无明显区别，而细胞外 pH(pHe) 和细胞内酸性囊泡内的 pH(pHv) 明显低于正常细胞，提示可能与肿瘤细胞有较强的泌酸功能有关。(Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev, 2003, 29(6): 541-549)。

为了躲避酸性微环境的毒性，肿瘤细胞遂向外排出氢离子，最终产生细胞外的酸性环境以及细胞内的碱性环境。肿瘤细胞通过上调细胞质膜的氢离子相关转运蛋白，如钠氢交换蛋白(Na^+/H^+)、Na^+/K^+-ATPase、囊泡型 H^+-ATPases、H^+/Cl^-共输送体和单羧酸转运蛋白(MCT)等，来实现这一机制（Harguindey S, et al. The role of pH dynamics and the Na+/H+ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature, [J]. Biochim BiopHys Acta, 2005, 1756(1): 1-24)。

因此，发明人判断如果通过增加压力让肿瘤细胞泌酸功能降低，那就会引起肿瘤细胞内 pHi 降低，使其酸中毒，从而诱导肿瘤细胞凋亡。而增加压力，即使肿瘤细胞外环境的 pH(pHe) 降低，让肿瘤细胞的运输 H^+离子的质子泵增加压力，并最终崩溃。

有较多的文献支持，酸性环境能够诱导肿瘤细胞发生凋亡。比如，酸性环境，通过 p53

介导诱导人腺癌和胃癌的细胞株凋亡（A C Williams, et al.An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis，Oncogene. 1999 May 27;18(21):3199-204）。

实验表明：给予体外培养的胃癌 AGS 细胞一个 pH 为 6.0 的酸性环境,这种酸性环境使细胞外 H^+离子浓度升高,可能通过抑制肿瘤细胞的 NHE^{-1}的 Na^+-H^+ 交换功能使细胞内糖酵解产生的过多 H^+离子无法排出使本来偏碱性的细胞内环境明显酸化，这样既起到了改变胃癌细胞外环境的作用，同时也改变了细胞内环境。胃癌细胞的这种内外环境的酸化作用改变了适合它生长增殖的细胞内外环境的酸碱度，从而使大部分胃癌细胞停止增殖（高艳等，《胃癌 A G S 细胞内 pH 值的测定及酸性环境对其增殖和凋亡的影响》，《现代生物医学进展》，2008 年 09 期）。

Rich IN 等证明了从白血病患者体内获得的白细胞系及外周淋巴血细胞有着比正常造血组织细胞普遍的、具有统计学意义的高的 pH 值。说明了在胞内 pH 值与正常造血细胞和白血病细胞的细胞周期调控之间存在一种直接的关系。利用这种关系，他们用 Na^+/H^+交换体的抑制剂 5-（N，N-hexamethylene）-amiloride（HMA）处理白血病细胞，降低了胞内 pH 值，从而诱导了细胞凋亡。（Rich IN，Worthington-White D，Garden OA，Musk P.Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na + /H + exchanger.Blood.2000，15，95（4）:1427～1434）。

在本发明的一个实施方式中，我们采用酸性二氧化氯溶液靶向给予肿瘤细胞，使肿瘤细胞发生凋亡,并且随着酸性环境的加强，肿瘤细胞死亡率相应上升。

本领域技术人员均理解强氧化剂和酸性环境对正常细胞有损伤作用，也就是说，酸性二氧化氯溶液对正常细胞也有加速凋亡作用。但是，本发明人认为，正常细胞的损伤会刺激机体干细胞的再生，因此一般性损伤可以完全被修复；另外，衰老细胞或癌细胞是功能不全的细胞，他们抵御氧化剂或酸性环境的凋亡诱导能力更弱。因此本发明的技术方案是靶向明确而副作用较小的一种抗衰老或抗肿瘤的技术。

在一些实施例中，本发明证明了酸性二氧化氯制剂对衰老细胞或肿瘤细胞具有更强的凋亡诱导作用，而对正常细胞损伤较小，或者说这种损伤是在可以被弥补的程度。

本发明所述的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂可以单独包含二氧化氯的单一剂型或者包含二氧化氯前体的若干份组合。其中单独包含二氧化氯的单一剂型可以如下地制成：

方法 1：向水中添加 pH 调节剂，制成 pH 值为 1.5～6.5 的酸性水溶液。通过合乎规范，

并且浓度在 99.9%以上二氧化氯气体的制备方式（优选为亚氯酸盐与酸反应）产生二氧化氯气体。通过将该二氧化氯气体向上述酸性水溶液中鼓泡并溶解从而制备 500～2900ppm 的二氧化氯溶液。该溶液在使用于本发明所述用途之前，应当避光密闭保存，并一直保存于 4℃～15℃较低温状态下。该制备含二氧化氯制剂的方法并不要求一定是水溶液，唯有保证在施用于目标组织时能够在目标组织中发挥作用的物质主要为二氧化氯，且在一定酸性环境下。

方法 2：将二氧化氯前体溶解于水中制备 1%～40%的水溶液。向该水溶液中加入含有 pH 调节剂的酸性溶液（优选为 2%～50%的柠檬酸溶液），调节混合溶液的 pH 值为 1.5～6.5。该溶液在使用于本发明所述用途之前，应当避光密闭保存，并一直保存于 4℃～15℃较低温状态下。该制备含二氧化氯制剂的方法并不要求一定是水溶液，唯有保证在施用于目标组织时能够在目标组织中发挥作用的物质主要为二氧化氯，且在一定酸性环境下。

包含二氧化氯前体的若干份组合可以如下地制成：将二氧化氯前体溶解于水中制备 1%～40%的水溶液，这是第一份溶液；用 pH 调节剂制备出酸性溶液（优选为 2%～50%的柠檬酸溶液），这是第二份溶液。在使用于本发明所述用途之前，现场混合以上溶液，最终混合溶液的 pH 值调整为 1.5～6.5，待反应产生二氧化氯后，将该溶液施用于目标组织。该制备含二氧化氯制剂的方法并不要求一定是水溶液，唯有保证在施用于目标组织时能够在目标组织中发挥作用的物质主要为二氧化氯，且在一定酸性环境下。

作为能在本发明中使用的二氧化氯前体，可以举出例如亚氯酸碱金属盐、亚氯酸碱土类金属盐。作为亚氯酸碱金属盐，可以举出例如亚氯酸钠、亚氯酸钾、亚氯酸锂；作为亚氯酸碱土类金属盐，可以举出例如亚氯酸钙、亚氯酸镁、亚氯酸钡。

其中，不仅从获得容易的理由，而且从二氧化氯活性的持续性优异的观点出发，优选亚氯酸钠、亚氯酸钾，更优选亚氯酸钠。

作为能在本发明中使用的 pH 调节剂，只要是具有缓冲性的酸就可以很好的使用。

作为有机酸或其盐可以举出甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸、乙醇酸、富马酸、丙二酸、马来酸、草酸、琥珀酸、丙烯酸、巴豆酸、戊二酸及他们的盐。

作为无机酸可以举出盐酸、磷酸、硼酸、偏磷酸、焦磷酸、氨基磺酸等。作为无机酸盐，例如可以举出磷酸二氢盐（钠盐、钾盐，下同）、磷酸二氢盐与磷酸氢盐的混合物等。pH 调节剂可以单独使用 1 种，也可以并用 2 种以上。

从使用于人体安全方面的考虑，pH 调节剂优选为柠檬酸、乙酸和磷酸二氢钠，更优选为柠檬酸。

另外，二氧化氯液剂的最终 pH 值优选为 1.5～5.5，更优选为 1.5～3.5。

本发明中的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂优选为液剂。

本发明中的细胞凋亡诱导剂的药剂量因患者的年龄、体重、疾病性质和状况而变化。但是在成人的情况下，例如为每日 1 毫克至 5000 毫克的二氧化氯，优选为每日 1 毫克至 1000 毫克的二氧化氯。

本发明中的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂可以通过多种方式给药。含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂可以全身性地给药，如通过静脉内、动脉内或腹膜内给药；也可以局部患处的直接给药，该方法可以通过透皮、穿刺等方法直达患处给药。

本发明中的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂的给药方式，可以通过任何一种能到达预期组织的途径给药，比如，可以经由静脉点滴、静脉注射、动脉注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、心内注射、腹腔注射、鞘内注射、关节内注射、穿刺注射、直肠给药、舌下给药、鼻腔给药、经皮给药、吸入或者局部给药到目标的器官或组织等，但不限于这些。

通过以上方式给药时，因目标组织的大小，本发明中的细胞凋亡诱导剂的有效量范围为每日 0.1～500mg/kg 二氧化氯,有时候目标组织用面积更容易表述，则本发明中的细胞凋亡诱导剂的有效范围为每日 0.1～500mg 二氧化氯/100cm^2，按所述剂量给药时，至少 10 天后有效。

无论如何，本发明所述的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂，唯有保证在适用于目标有效剂量的二氧化氯以合适方式进入目标组织中，发挥诱导细胞凋亡作用，而不限于任何的形式、方式和步骤，及其他辅助性物质的帮助。

《中国药典制剂通则》中的任何制剂都能够作为本发明中的细胞凋亡诱导剂的剂型。本发明方法中的细胞凋亡诱导剂作为药物的剂型的实例包括直接用于体内的注射剂（包括混悬液、乳剂）；软膏剂（包括油脂性软膏、乳剂型软膏（霜）、水溶性软膏等）、吸入剂、液剂制剂（包括滴眼剂、滴鼻剂等）、栓剂、贴剂、糊剂、洗剂等外用剂；或片剂（包括糖衣、薄膜、胶衣）、液体制剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂（包括细粒级）、丸剂、糖浆剂、含片等。这些制剂可按照中国药典制剂通则的方法进行制备。

此外，本发明方法中的细胞凋亡诱导剂给药时还可以包括可药用的固态或液态载体或介入治疗材料。作为可药用的固态或液态载体，可列举溶剂、稳定剂、助溶解剂、乳化剂、悬浊剂、缓冲剂、等渗剂、着色剂、基质、增稠剂、赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、包衣剂、矫味剂、调理剂、发泡剂、高吸水性树脂、表面活性剂、渗透促进剂和 pH 调节剂等，但并不限于这些。

具体实例包括去离子水、乳糖、白糖、果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖醇等糖或糖醇；

结晶纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、低取代羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯、羟甲基纤维素、羟甲基纤维素钙、羟甲基纤维素钠、交联羟甲基纤维素钠、羟甲基乙基纤维素、乙酸邻苯二酸纤维素等纤维素及其相关衍生物；玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、环糊精、支链淀粉等点功夫及其相关衍生物；琼脂、藻酸钠、阿拉伯胶、明胶、胶原、虫胶、黄蓍胶、黄原胶等天热高分子（海藻类、植物粘质、蛋白质等）；聚乙烯吡咯烷酮、氨基烷基甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、羟基乙烯基共聚物、聚乙烯醇、二甲基聚硅氧烷等合成高分子；橄榄油、可可油、巴西棕榈蜡、牛油、硬化油、大豆油、芝麻油、山茶油、亚麻籽油、石蜡、液体石蜡、黄蜂蜡、白色凡士林、椰子油、微晶蜡等油脂类；硬脂酸、硬脂酸铝、硬脂酸钙、硬脂酸镁、柠檬酸三乙酯、三乙酯甘油酯、中链脂肪酸三甘油酯、硬脂、肉豆蔻酸异丙酯等脂肪酸及其衍生物；乙醇、甘油、硬脂醇、鲸蜡醇、丙二醇、聚乙二醇等醇和多元醇；氧化锌、磷酸氢钙、沉降碳酸钙、合成硅酸铝、硅酸酐、高岭土、干燥氢氧化铝凝胶、合成水滑石、氧化钛、滑石、膨润土、硅酸铝镁、硫酸铝钾、次没食子酸铋、次水杨酸铋、乳酸钙、柠檬酸钠、氯化钠、碳酸氢钠等无机物质和金属盐化合物；蔗糖脂肪酸酯、硬脂酸聚烃氧酯、氢化蓖麻油聚氧乙烯醚、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇、倍伴油酸脱水山梨醇酯、三油酸脱水山梨醇酯、单硬脂酸脱水山梨醇酯、但棕榈酸脱水山梨醇酯、单月桂酸脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯、单硬脂酸甘油酯、十二烷基硫酸钠、聚桂醇等表面活性剂；二甲基亚砜及其类似物、氮酮类化合物、吡咯酮衍生物、醇类化合物及脂肪酸类化合物等渗透促进剂；色素；香料等。但并不限于这些。

介入治疗材料的实例包括注射器、支架、人工血管、穿刺注射器、导管、球囊等，但并不限于这些。

本发明中的含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂在给药前，可以依据给药方式而施用麻醉剂，如巴比妥酸盐等注射型麻醉剂、一氧化二氮等吸入型麻醉剂、利多卡因等表面麻醉剂等，但不限于这些。

本发明中的细胞凋亡诱导剂应用于哺乳动物，哺乳动物的具体实例包括人、猴、狗、猪、猫、兔、大鼠和小鼠。其中，人是优选者。

实施例

提供以下实施例以说明本发明，而不以任何方式限制本发明。

实施例 1：含二氧化氯制剂对增生性瘢痕皮肤成纤维细胞凋亡的影响

增生性瘢痕作为一种影响器官功能、美观的疾病，病因有多种，但凡损伤累及真皮深层的损伤，都有可能产生增生性瘢痕。普遍认为成纤维细胞凋亡不足是增生性瘢痕产生的原因（Ogawa, R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertropHic scars and keloids [J]. Plast Reconstr Surg, 2010,125:557-568）。常识表明，同样大小的伤口，相对比年轻人，老年人的伤口愈合慢且容易留下疤痕。因此，增生性瘢痕的形成可以理解为一种皮肤老化的现象，通过诱导成纤维细胞凋亡可能是治愈瘢痕性皮肤的好方法。

1）凋亡试验

增生性瘢痕患者共 6 例，男 5 例，女 1 例，平均年龄 42 岁。实验共分 4 组：瘢痕中央部（中央 2/3 半径范围内）、瘢痕边缘部（周边 1/3 半径范围内）、瘢痕周围皮肤（距瘢痕疙瘩边缘 0.5cm 范围内）、瘢痕病人其他部位正常皮肤。

成纤维细胞的培养：所取标本按上述方法分组后在无菌条件下切除其表皮及皮下组织，在少量胎牛血清中将标本切成 $1mm^3$ 左右的组织块，在 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下培养 4-6h，使组织块粘附于瓶壁上，然后加入含 15%胎牛血清的 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)培养基适量，3-4 天换液 1 次，2-3 周后，原代细胞长满并汇合成片，每 3-5 天传代 1 次，实验用第 6-8 代细胞。

用去离子水配置浓度为 7.47%亚氯酸钠和 1.59%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 16.7%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 3～5 分钟，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤，用去离子水稀释，制备不同浓度的二氧化氯酸性溶液。

细胞接种并施加不同处理因素诱导细胞凋亡。各组分别取一瓶处于对数生长期的细胞，接种于 6 孔细胞培养板中，每组细胞于每块板接种 1 个孔（1×10^5 个细胞/孔），共接种 6 块板 24 个孔，继续在 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下培养 48-72h，至细胞长满孔底，取其中 1 块板，吸出培养基，用 Hank 液(一种平衡盐溶液)洗涤后加入不含胎牛血清的 DMEM 培养基，另取 3 块板分别加入含二氧化氯制剂，使其终浓度分别达到 100ppm、1000ppm、2900ppm，取 1 块板加入 FasMcAb(Fas 单抗)，使其终浓度达到 1μg/ml，另外 1 块板不施加任何处理因素，继续培养 24h 后检测其凋亡率。

PI 染色、流式细胞仪检测比较各组成纤维细胞的凋亡率。将上述处理过的细胞消化后收集于 10ml 离心管中，1000r/min 离心 10min，预冷的 PBS(磷酸盐缓冲溶液)洗遍后加入 70%乙醇 4℃固定过夜，再低速离心 10min，PBS 洗涤后重悬细胞，在剩余的 0.5ml 细胞悬液中加

入 RNase A 2μl（20mg/ml），37℃孵育 30min 后立即投入冰浴中停止 RNase A 作用，再加入 500μl PI 染液（100μg/ml）避光孵育 30min，吹散细胞，300 目滤网过滤后在流式细胞仪上进行细胞 DNA 分析检测细胞凋亡率。

所有各组细胞经无血清培养 24h 后其细胞凋亡率均有不同程度的增高，然而经过比较各组无血清培养后细胞凋亡的增长率，发现正常皮肤显著高于瘢痕疙瘩边缘部（P＜0.01），而瘢痕疙瘩周围皮肤和瘢痕疙瘩中央部介于两者之间，与各组比较差异均无显著性意义（P＞0.05，表 1）。这说明被看作老化组织的瘢痕处具有明显的抗凋亡能力，所以瘢痕组织不仅不能得以自动清除，反而会增生。

表 1 无血清培养 24h 后瘢痕及其周围皮肤成纤维细胞凋亡率

取材部位	无血清培养 24h 后	细胞凋亡增长率
瘢痕边缘部	9.44±1.43	84±20
瘢痕中央部	10.52±1.50	109±25
瘢痕周围皮肤	10.90±1.79	106±14
正常皮肤	110.6±1.99	133±28*

*注：*与瘢痕边缘部比较，P＜0.01*

FasMcAb 作用下正常皮肤的成纤维细胞凋亡率明显高于瘢痕及其周围皮肤成纤维细胞凋亡率（*P＜0.01*，表 2）。这也说明瘢痕处组织具有抗凋亡能力。

表 2 FasMcAb 作用下瘢痕及其周围皮肤成纤维细胞凋亡率

取材部位	FasMcAb 作用（1μg/ml）
瘢痕边缘部	*7.32*±2.18
瘢痕中央部	*6.52*±1.90
瘢痕周围皮肤	*13.08*±1.97
正常皮肤	*63.04*±6.59*

*注：*与瘢痕边缘部比较，P＜0.01*

在二氧化氯制剂作用下，四组成纤维细胞凋亡率随着二氧化氯浓度梯度的升高逐步提高，该提高具有显著性（P＜0.01，表 3）。这说明酸性环境下的二氧化氯制剂对增生性瘢痕组织

具有明显的促凋亡作用。

表 3 二氧化氯作用下瘢痕及其周围皮肤成纤维细胞凋亡率

取材部位	二氧化氯作用浓度（ppm）			
	0	*100*	*1000*	*2900*
瘢痕边缘部	*5.10*±0.27	*37.30*±4.18	*91.25*±6.89	*99.12*±1.63
瘢痕中央部	*4.94*±0.42	*36.52*±4.91	*93.24*±7.32	99.65±1.54
瘢痕周围皮肤	*5.28*±0.62	*50.08*±5.68	*90.65*±9.65	*99.42*±1.87
正常皮肤	*4.88*±0.24	*73.21*±7.56	*87.98*±13.60	*99.87*±1.02

2）对疤痕的治疗

用去离子水配置浓度为 7.47%亚氯酸钠和 1.59%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 16.7%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 3～5 分钟，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤。制备出二氧化氯制剂。

使用以上二氧化氯制剂分两次对增生性瘢痕进行治疗，一遍直接用该二氧化氯制剂，第二遍再加等量二甲基亚砜。即两遍都直接涂抹瘢痕处，中间间隔 30min，连续涂抹 15 天。

治疗后即刻增生性瘢痕呈暗红色，瘢痕表面见均匀分布的灰色至微黄的点状气化皮屑，无明显渗血、渗液。治疗后第一天，创面干燥见红色点状痂皮形成，此后至治疗后第五天，治疗的创面呈鲜红色，创面痂皮逐渐脱落。至治疗后第二十天，治疗创面完全愈合，痂皮全部脱落，同时可观察到瘢痕的中央的乳头状突起高度变得低平，瘢痕处皮肤明显光滑一些，有色素沉着。治疗后 25 天左右，有光滑的新鲜皮肤生成，在 40±20 天左右的时间，原来疤痕不规则形状完全平坦。

取治疗前、治疗后 1h、治疗后 2 天、7 天、14 天、28 天瘢痕，切取疤痕处全层组织，切取组织经 4%多聚甲醛固定后常规脱水、石蜡包埋，切片后行 HE 染色观察各组各时期镜下成纤维细胞形态、密度，胶原纤维排列、毛细血管增生情况，TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)法检测成纤维细胞凋亡率变化。

采用 TUNEL 法，染色区域位于细胞核。光镜下观察正常的成纤维细胞细胞核呈蓝色，为阴性反应，凋亡细胞的细胞核呈深浅不一的棕褐色，为阳性反应，即凋亡细胞。40 倍光镜下观察，每张切片随机选择 3 个成纤维细胞阳性细胞数最多的高倍视野进行计数，阳性细胞反

应率(R)=阳性细胞数 / 细胞总数，结果取平均数。

在成纤维细胞、角朊细胞、血管内皮细胞中均可见凋亡小体，即凋亡细胞。治疗后即刻即有明显的成纤维细胞凋亡增多表现，治疗后 1h、2 天、7 天、14 天、28 天治疗组成纤维细胞凋亡率逐渐增高，各时期凋亡率均比治疗前高，P 值<0.01，说明差异有统计学意义。

表 4 瘢痕组织中 TUNEL 检测成纤维细胞凋亡率的变化

治疗前	1h	2 天	7 天	14 天	28 天
7.42 ± 2.28	16.54 ± 1.23*	25.13 ± 1.48*	46.65 ± 2.10*	87.32 ± 4.12*	95.87 ± 3.01*

*代表与治疗前相比 P<0.01。

因此不管从体外培养，或是直接治疗，都显示本发明的酸性环境下的二氧化氯制剂对凋亡不足的组织可以诱导其中细胞加速凋亡，从而使皮肤健康并年轻化。

实施例 2：含二氧化氯制剂对皮肤抗衰老的美容试验

用于皮肤美容的含二氧化氯制剂的化妆品制备：用去离子水配置浓度为 7.47%亚氯酸钠和 1.59%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 16.7%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 3～5 分钟，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤。再加入等体积 90%的二甲基亚砜，然后装入玻璃瓶密封保存，制成针对皮肤抗衰老或年轻化的化妆品，用于皮肤涂抹。

通过女性观察员(100 名) 实际涂抹到皮肤上使用，按照下述的评价区分，评价“黏腻使用感的有无”、“发涩感的有无”、“皮肤上的移动的有无”以及“对皱纹、松弛(皮肤的拉伸感) 的效果的有无”。

从结果看（表 5），本发明的二氧化氯制剂作为化妆品具备非常优异的美容护肤作用。

表 5：皮肤美容使用效果观察

关于黏腻使用感		关于发涩感		对皮肤的密合性		对皱纹、松弛效果	
黏腻非常少	99	无发涩感（光滑感）	98	密合性强	90	有效果	90
黏腻少	1	感到发涩	1	一般	5	稍微有效果	4
略微黏腻	0	发涩	1	弱	5	无效果	6

采用本发明以上制备的化妆品为例进行疗效观察，在人群中进行功效测试，观察使用者在使用过程中的肌肤水分含量、弹性、细纹、粗糙度等改善情况。选取 30 名健康女性和 10 名健康男性，每天涂抹自由选择皮肤位置，共 15 天，在使用前、1h、7 天（使用 1h 后）、第 14 天（使用 1h 后）、第 28 天对受试者进行皮肤状况的评估，包括临床判断及非创性仪器评估。临床评判包括以下参数：皮肤水分含量、皮肤弹性、皮肤光泽度、皮肤粗糙度/光滑度、肤色均匀度、细纹的改善。非创性仪器评估是利用皮肤水分测定仪 Corneometer CM820 测定皮肤水分含量，利用皮肤弹性测定仪(Cutometer SEM 575) 测定皮肤弹性。实验的数据如表 6 所示。

由表 6 可见：使用此化妆品后，皮肤含水量急剧增加，说明产品对改善皮肤干燥效果非常明显，随着时间的推进到第 28 天时，皮肤的含水量继续得到持续的改善。

皮肤弹性值越大越好，说明皮肤弹性越好，由表 6 可看出 7 天后，皮肤的弹性得到了明显的改善，弹性变得越来越好并与基础值之间有显著差异性。

光泽度等四个指标值，数据数值越少，说明改善越好。从上述数据结果可以看出，与基础值相比，各项参数在第 7、14、28 天均有改善，与基础值之间有显著差异性(表现在各项数值随时间推移的下降趋势)。

表 6 含二氧化氯化妆品使用后皮肤改善情况

时间	皮肤含水量（%）	皮肤弹性	光泽度	粗糙度/光滑度	肤色均匀度(美白)	细纹改善
使用前－基础值	30.1±3.5	0.70±0.21	4.55±0.64	3.74±0.47	4.81±0.51	5.16±0.67
1h	48.3±5.5*	0.69±0.19	4.55±0.55	3.72±0.32	4.80±0.43	5.10±0.56
7 天	58.6±4.3*	0.74±0.13*	3.68±0.38*	3.19±0.41*	4.35±0.53	4.84±0.53
14 天	59.7±3.6*	0.79±0.14*	3.18±0.40*	2.85±0.29*	4.12±0.42	4.56±0.49
28 天	47.5±6.3*	0.80±0.23*	3.02±0.29*	2.79±0.31*	4.01±0.39*	4.13±0.56*

*注：*与基础值相比，P<0.01。*

因此本发明的含二氧化氯的化妆品具备护肤、补水、祛斑、美白和祛皱等使皮肤年轻化的美容作用。

实施例 3 含二氧化氯制剂治疗痤疮的试验

痤疮是青少年经常反复发作的皮肤问题，主要原因是老化角质层不能及时清除，堵塞毛孔，导致油脂堆积，形成肿胀（粉刺）；在痤疮杆菌的侵袭后感染，发红形成脓包。由于二氧化氯本身是高效的杀菌剂，所以只用保证老化角质细胞得到清除，那么二氧化氯就可以治疗痤疮。

用于祛痘（治疗痤疮）的含二氧化氯制剂的化妆品制备：用实施例 2 的制备方法，制成祛痘溶液，用于痤疮皮肤涂抹。

选择 30 位痤疮问题青年（男 20，女 10），平均年龄 22 岁，每天用以上配置的含二氧化氯制剂涂抹痤疮患处一次，连续 5 天。具体效果如下表所示。

表 7 痤疮治疗试验

时间	3 天	5 天	7 天	11 天
治疗情况	患处变红，肿胀消退	患处有结痂，脱皮现象	患处基本变平。	痤疮消失，皮肤变得平滑

30 人祛痘，连续用 5 天，90%痤疮痊愈。说明本发明的含二氧化氯制剂治疗痤疮非常有效。

实施例 4 含二氧化氯制剂通过静脉注射对小鼠寿命影响的试验

二氧化氯制剂制备：用去离子水配置浓度为 2.49%亚氯酸钠和 0.53%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 5.57%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 5～10 分钟，加入等量 50%二甲基亚砜，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤，马上装入注射器。制备一次，使用一次。

C57BL/6 雄性小鼠，12 月龄，每只小鼠单笼饲料。100 只小鼠随机分为两组：实验组（50 只）和对照组（50 只）。两组均充足的饲料和饮水，实验组自 15 月龄后，每周一次，每次以 10ml/kg 的剂量通过静脉注射由以上方法制备的二氧化氯制剂。详细记录各组每个小鼠自然死亡的日期，并计算各组小鼠的平均寿命和最大寿命。

结果显示 ：对照组小鼠的平均寿命为 696.5 天，试验组小鼠的平均寿命为 778.3 天，每周注射一次的二氧化氯制剂使小鼠的平均寿命延长 11％。说明，注射二氧化氯制剂明显延长小鼠平均寿命 （ 如表 8)。

按目前常用的最大寿命计算方法，即该组最后自然死亡 10％小鼠的平均寿命为最大寿命，

结果显示 ：对照组小鼠的最大寿命是 932 天，试验组小鼠的最大寿命是 987.5 天，注射二氧化氯制剂使小鼠的最大寿命延长 5.9%，说明 ：注射二氧化氯制剂具有明显延长小鼠的最大寿命的作用。

表 8 注射二氧化氯制剂对小鼠寿命的影响

组别	N	平均寿命	平均寿命提高	平均最大寿命	平均最大寿命提高
对照组	50	696.5±137.6		932±40.6	
实验组	50	778.3±120.3*	11%	987.5±20.3*	5.9%

*注：*与对照组相比 P<0.05*

在小鼠月龄 19 月的时间，从实验组和对照组分别随机选择 10 只小鼠，进行水迷宫和平衡耐力测试。两测试时间间隔 2 周。

水迷宫试验：实验进行前连续训练 3 天,2 次/天。方形水迷宫装置为 50cm×30cm×15cm 的黑色木槽、内设起步区、4 盲端曲折回路、安全台。水深控制在 12cm,水温为(25±2) ℃。小鼠由入口端放入开始计时,自动记录触及盲端的次数,以小鼠爬上安全台为结束时间,称为潜伏期。潜伏期设定最大为 120s,筛除超过 120s 仍找不到出口的动物。

平衡耐力测试：实验进行前连续训练 3 天，2 次/天。在两根固定柱子之间拉一根直径为 2mm 的铁丝，距离为 2m,高度为 1m。用绳子捆绑下肢,使小鼠用上肢握紧铁丝，用秒表计算开始握紧到摔下的时间。观察时间设定为 30s，筛除 30s 内摔下的动物。

由表 9 可见，各组动物第 1 天记忆力无差异；实验第 3 天、6 天和 9 天,试验组的错误次数及潜伏期明显少于对照组。可见二氧化氯制剂显著提高了小鼠的学习能力和记忆能力。

表 9 各组小鼠在不同时间内记忆力的比较

组别	1 天	3 天	6 天	9 天
错误次数				
对照组	7.60±2.17	7.80±2.48	7.89±2.56	8.20±2.78
实验组	7.50±2.01	6.80±1.48*	6.30±2.01*	5.30±1.64*
潜伏期				
对照组	50.80±16.89	52.10±24.33	56.40±14.30	60.20±23.96
实验组	50.00±15.69	48.60±24.21*	43.50±17.58*	40.90±25.46*

*注：*与对照组相比 P<0.05*

由表 10 可见，试验组小鼠在 1 天、3 天、6 天和 9 天的平衡耐力显著高于对照组。说明二氧化氯制剂显著提高了小鼠的机体能力。

表 10 各组小鼠在不同时间内平衡耐力的比较

组别	1 天	3 天	6 天	9 天
对照组	88±48.39	93±45.63	102±56.34	112±60.50
实验组	132.90±46.53*	140.30±56.36*	149.35±42.64*	153±60.35*

*注：*与对照组相比，P<0.05*

从以上多个实施例的试验数据，我们可以得出，酸性环境下的二氧化氯制剂能够显著提高动物的寿命，并伴随提高记忆力和机体能力，其机理应该是二氧化氯制剂能够诱导衰老细胞发生凋亡从而衰老细胞得以被清除，机体自身的再生能力将恢复年轻化。因此本发明所述的二氧化氯制剂可以被制成化妆品用于皮肤年轻化的美容，也可以制成药品用于使机体年轻化，从而预防老年性疾病的发生。

实施例 5 二氧化氯制剂对人非小细胞肺癌细胞 A549 的杀伤作用。

用去离子水配置浓度为 7.47%亚氯酸钠和 1.59%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 16.7%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 3～5 分钟，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤，用去离子水稀释，制备不同浓度的二氧化氯溶液。

1）实验方法

用含 10% 胎牛血清的 PRMI1640 培养液，并置 37℃、5%CO2 培养箱中培养人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞，每 3 天用 0.25％胰蛋白酶液消化细胞进行传代，并更换培养液。按 0.7×10^4/ 孔浓度接种于 96 孔板上，置 37℃、5%CO2 培养箱中培养 24h 后，分别加入二氧化氯溶液，每种二氧化氯溶液按照终浓度 100ppm、200ppm、400ppm、700ppm、1000ppm、1500ppm、2000ppm、2900ppm 加入，阴性对照组细胞加入 0.1%（v/v）的 DMSO（二甲基亚砜），另设调零组（即细胞培养孔中没有细胞，只加入细胞培养液）。每个组设四个复孔，然后将 96 孔板置 37℃、5%CO2 培养箱再培养 24h，然后按下述方法检测化合物对肿瘤细胞的杀伤作用。

2）检测方法 ：

通过乳酸脱氢酶（LDH）释放实验，采用乳酸脱氢酶检测试剂盒检测肿瘤细胞死亡率，具体操作方法按照所述乳酸脱氢酶检测试剂盒的说明书进行。用检测缓冲液（Assay Buffer）重悬反应底物（Substrate Mix)。取 96 孔细胞培养板中每个组的 3 复孔的培养上清液 50μl 到一个新的 96 孔板中，各组剩下的一个复孔加入终浓度为 0.9%（V/V）的 Triton-x100(试剂盒提供)，并置于 37℃孵箱中 50 分钟以裂解细胞后，取 50μl 上清液加入新的 96 孔板中，然后在新的 96 孔板中每孔再加入等体积的重悬好的反应底物液，室温孵育 30 分钟后，每孔加入 50μl 终止液即 1M 的乙酸（试剂盒中提供）终止反应，用酶标仪(490nm 波长)测每孔的 OD 值，裂解细胞孔所检测的 OD 值记为“细胞最大释放 OD 值”，阴性对照组的 OD 值记为“自然释放对照组 OD 值”。

根据检测的 OD490 值，按照下列公式计算细胞死亡率，结果以均数±标准差表示，并且采用 SPSS 软件 Probit 模块计算半数杀细胞浓度，即 IC_{50}。

肿瘤细胞死亡率（%）=(实验组 OD 值-自然释放对照组 OD 值)/(细胞最大释放 OD 值-自然释放对照组 OD 值)

3）检测结果 ：

如表 10 所示，二氧化氯制剂可有效杀死 A549 细胞，且随着浓度的增加，它们对 A549 的杀伤作用也剂量依赖性地增加，通过 SPSS 软件 Probit 模块计算，二氧化氯制剂导致半数 A549 细胞死亡的有效剂量（IC_{50}）为 495ppm。

表 10 A549 细胞的体外杀伤

ClO2 浓度（ppm）	0	100	200	400	700	1000	1500	2000	2900
细胞死亡率	0	4.6±1.1	7.0±2.9	23.6±5.9	71.9±4.1	99.0±3.9	99.8±2.4	100±2.1	100±1.4
IC_{50}	495ppm								

本实施例证实，酸性二氧化氯制剂能够显著地杀死 A549 肿瘤细胞。

实施例 6 二氧化氯制剂对人宫颈癌细胞 HeLa 的杀伤作用

按照实施例 5 的方法制备二氧化氯制剂，按实施例 5 的细胞培养方法将人宫颈癌细胞 HeLa 细胞按保种培养并接种于 96 孔培养板中。按实施例 5 中的方法设实验组、对照组和调零组，并通过乳酸脱氢酶（LDH）释放实验，检测二氧化氯溶剂所导致的 HeLa 细胞死亡率，并计算导致半数 HeLa 细胞死亡的剂量（IC_{50}）。

检测结果 ：如表 11 所示，二氧化氯制剂可有效杀死 HeLa 细胞，且随着化合物浓度的

增加，它们对 HeLa 的杀伤作用是剂量依赖性地增加，通过 SPSS 软件 Probit 模块计算，二氧化氯制剂导致半数 HeLa 细胞死亡的有效剂量为 405ppm。

表 11：二氧化氯制剂对 HeLa 细胞的体外杀伤

二氧化氯浓度（ppm）	0	100	200	400	700	1000	1500	2000	2900
细胞死亡率	0	8.0 ± 1.0	13.1 ± 2.1	43.6 ± 5.9	99.0 ± 4.1	100 ± 3.2	100 ± 1.4	100 ± 0.9	100 ± 0.4
IC_{50}	405ppm								

实施例 7 ：采用乳酸脱氢酶释放实验，检测二氧化氯制剂对多种人类肿瘤细胞，包括乳腺癌、卵巢癌、肝癌、鼻咽癌、胃癌、喉癌、胰腺癌、黑色素瘤、膀胱癌和白血病细胞的杀伤作用。

按照实施例 5 的方法制备二氧化氯制剂。按实施例 5 中的方法保种培养乳腺癌细胞（MCF-7）、卵巢癌细胞（SKOV3）、肝癌细胞（Bel-7402）、鼻咽癌细胞（HNE）、胃癌细胞（MKN-45）、喉癌细胞（Hep-2）、胰腺癌细胞（Pan-1）、黑色素瘤细胞（A375）、膀胱癌细胞（Biu-87）、白血病细胞（Jurkat）同样采用含 10% 胎牛血清 PRMI1640、置于 37℃、5%CO2 培养箱中培养，并按常规悬浮细胞培养方式进行传代，即在传代时先做离心处理去除旧培养液，然后添加新培养液。然后按实施例 5 方法设实验组、对照组和调零组，并通过乳酸脱氢酶（LDH）释放实验检测肿瘤细胞死亡率，并计算导致半数肿瘤细胞死亡的剂量（IC_{50}）。

检测结果 ：如表 12 所示，二氧化氯制剂可有效杀死各种肿瘤细胞，且随着二氧化氯浓度的增加，它们对各肿瘤的杀伤作用也剂量依赖性地增加。

说明，本发明提供的酸性二氧化氯制剂对于肿瘤细胞具有广谱的杀伤作用。

表 12 多种人肿瘤细胞在不同二氧化氯浓度下的死亡率（%）

二氧化氯浓度（ppm）	100	200	400	700	1000	1500	2000	2900	IC_{50}
MCF-7	4.2	30.1	56	84	97	100	100	100	350

SKOV3	5.6	22.3	39	64	87	99	100	100	502
Bel-7402	4.3	23.2	42	84	97	99	100	100	486
HNE	7.2	19.6	32	64	87	98	100	100	550
MKN-45	6.4	26.7	47	61.0	80.0	99	100	100	460
Hep-2	8.9	27.5	46	54.0	76.0	99	100	100	479
Pan-1	9.8	30.9	52	64.3	81.7	100	100	100	387
A375	7.8	29.4	51	63.7	81.3	100	100	100	398
Biu-87	4.5	20.8	37	68.0	84.0	99	100	100	499
Jurkat	11.9	34.5	57	67.3	83.7	100	100	100	360

实施例 8 二氧化氯制剂诱导肿瘤细胞凋亡的试验

对结肠癌细胞系 LS174T 和乳腺癌细胞系 Cama-1 这两个细胞系的死亡和细胞周期变化进行了分析。分别在不存在二氧化氯或存在 100ppm 二氧化氯（通过实施例 5 中的方法制备）的条件下，培养细胞 48 小时。用 1μg/ml 溴脱氧尿苷 (BrdU) 脉冲 30 分钟后，细胞在 70% 乙醇中于 4℃固定过夜，然后用 FITC 偶联的抗 BrdU 单克隆抗体和 3μg/ml 碘化丙锭染色。通过流式细胞术(FACS)分析细胞死亡和细胞周期。掺入 BrdU 是一种增殖测量方法，而碘化丙锭染色则可确定 DNA 含量，特别是正在经历细胞凋亡的近二倍体细胞群体。

数据显示，掺入 BrdU 的 LS174T 细胞的百分比从处理前的 27%变为 100ppm 二氧化氯制剂存在下培养 48 小时后的 6%。相反，具有近二倍体 DNA 含量的 LS174T 细胞的百分比，从处理前的 4%变为 100ppm 二氧化氯制剂存在下培养 48 小时后的 23%，说明 100ppm 二氧化氯制剂的细胞凋亡促进能力强。

数据还显示，掺入 BrdU 的 Cama-1 细胞的百分比，由处理前的 15%变为 100ppm 二氧化氯制剂存在下培养 48 小时后的 2%。相反，具有近二倍体 DNA 含量的 Cama-1 细胞的百分比，从处理前的 4%变为 100ppm 二氧化氯制剂存在下培养 48 小时后的 17%，表明 100ppm 二氧化氯制剂引发细胞凋亡。

这些数据表明，用 100ppm 二氧化氯制剂处理 48 小时，LS 174T 和 Cama-1 细胞系停止分裂，并经历细胞凋亡。

实施例 9 不同 pH 值情况下的二氧化氯制剂对肿瘤细胞的凋亡影响

为了进一步研究二氧化氯制剂处理对乳腺肿瘤细胞系的作用，在 Cama-1 细胞中，通过

膜联蛋白 V 染色对细胞死亡进行了分析。存在或不存在 400ppm 二氧化氯制剂（通过实施例 5 中的方法制备）时培养细胞 24 小时。通过膜联蛋白 V 染色和流式细胞术检测细胞凋亡。数据显示，超过 70％的 Cama-1 细胞被膜联蛋白 V 染色，进一步证明 400ppm 二氧化氯制剂诱导细胞凋亡。其他条件不变，但将 400ppm 二氧化氯制剂通过 pH 调节剂，使其 pH 值由 3.5 提高值 5.5，则只有超过 50%的 Cama-1 细胞被膜联蛋白 V 染色，这说明酸性环境有助于提高癌细胞凋亡率。

我们还试图测定二氧化氯诱导细胞凋亡的动力学。 500ppm 二氧化氯制剂（通过实施例 5 中的方法制备）存在或不存在时，pH 值为 3.5，培养 Cama-1 细胞。30 小时后，检测培养物中凋亡细胞(膜联蛋白阳性细胞)的百分比。数据显示，30 小时后，未处理细胞显示 15％的自发性细胞凋亡。然而，80％用二氧化氯制剂处理的细胞显示细胞死亡。具体地讲，Cama-1 细胞中，加入 500ppm 二氧化氯制剂后 9 小时便开始二氧化氯引发的细胞凋亡，处理 30 小时后，凋亡细胞达到 80％。其他条件不变，但将 500ppm 二氧化氯制剂通过 pH 调节剂使其 pH 值由 3.0 提高值 6，则只有超过 45%的细胞显示死亡，这说明酸性环境有助于提高癌细胞凋亡率。

我们于是试图测定二氧化氯制剂对人原代乳腺肿瘤细胞的作用。刚恢复的肿瘤单细胞悬液与 PBS 或二氧化氯(100ppm)制剂孵育 48 小时。通过 PI 染色测定细胞凋亡。百分比表示含有低含量 DNA 的细胞(subG0/G1 细胞)的比例，即凋亡细胞的比例。数据显示，19.5％用 PBS 处理的细胞具有低含量的 DNA，而 38.6％用二氧化氯制剂处理的细胞具有低含量的 DNA。因此，观察到相似的 100ppm 二氧化氯制剂对人乳腺原代肿瘤细胞的细胞凋亡作用。其他条件不变，但将 100ppm 二氧化氯制剂通过 pH 调节剂，使其 pH 值由 4.5 提高值 6，则只有 25％用二氧化氯制剂处理的细胞具有低含量的 DNA。，这说明酸性环境有助于提高癌细胞凋亡率。

结合以上肿瘤体外杀伤试验，本领域技术人员可以判断出，酸性二氧化氯制剂对肿瘤细胞具有明显的杀伤作用，而且这种作用机制是来自于酸性二氧化氯制剂可以显著诱导肿瘤细胞发生凋亡。

实施例 10 二氧化氯直接对 S180 荷瘤小鼠抑瘤效果及免疫器官指数的影响

用去离子水配置浓度为 7.47%亚氯酸钠和 1.59%氯化钠的混合溶液，制备出第一份溶液；用去离子水配置浓度为 16.7%的柠檬酸溶液，制备出第二份溶液。分别从不同份溶液的容器中取出相同体积的溶液，混合，等待溶液混合静止 5～10 分钟，再加入等体积 90%的二甲基亚砜，再用 0.22μm 的双层滤膜过滤。定量分别制备出 pH=5 和 pH=3.5 的 100ppm、500ppm 和 2000ppm 的二氧化氯制剂。

昆明小鼠，随机分为 8 组，每组 15 只，雌雄各半，分别为 ：空白对照组，环磷酰胺组，

二氧化氯低、中、高剂量组（pH 恒定为 5），二氧化氯低剂量(pH=3.5)组、中剂量(pH=3.5)组、高剂量(pH=3.5)组。环磷酰胺 ip 给药剂量为 20mg/kg，二氧化氯瘤内注射低、中、高剂量分别为 100ppm、500ppm 和 2000ppm，空白对照组给予生理盐水。各组小鼠接种 S180 实体瘤 24h 后给药，容积为 0.1ml/10g，1 次 /d，连续 14d。于停药 5 日处死小鼠，剥离瘤块及脾和胸腺并称重，计算抑瘤率及脾和胸腺指数。

由表 1 可以看出，与空白对照组相比，二氧化氯制剂（高 pH 值）低、中、高剂量组，环磷酰胺化疗组，以及二氧化氯制剂（低 pH 值）低、中、高剂量组均可显著抑制 S180 肿瘤的生长（$P < 0.05$、$P < 0.01$）。与高 pH 值组相比，二氧化氯制剂低 pH 值组均可显著提高二氧化氯制剂对 S180 肿瘤生长的抑制作用（$P < 0.05$）。

表 13 二氧化氯制剂对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用

组别	剂量 /(mg/kg)	瘤重 /(g)	抑瘤率 /(%)
空白对照		1.43±0.35	
环磷酰胺	20	0.34±0.14	76.2
二氧化氯（pH=5）	1（100ppm）	0.76±0.21*	46.6
	5（500ppm）	0.44±0.14*	69.4
	20（2000ppm）	0.15±0.06**	86.7
二氧化氯制剂（(pH=3.5）	1（100ppm）	0.60±0.13*	58.1
	5（500ppm）	0.32±0.11**#	77.6
	20（2000ppm）	0.07±0.05**#	95.1

*注：*P < 0.05，**P < 0.01 与空白对照组比 ；#P < 0.05，##P < 0.01 与高 pH 值组比*

由表 14 可以看出，与空白对照组相比，环磷酰胺化疗组小鼠的胸腺、脾脏指数显著性降低（$P < 0.01$），说明化疗手段的副作用很大。二氧化氯制剂中、高剂量组小鼠的胸腺和脾脏指数都显著性增高（$P < 0.05$）。针对高低 pH 值，二氧化氯的影响不显著。说明二氧化氯促进肿瘤凋亡过程中对免疫器官的副作用微乎其微。

表 14 二氧化氯制剂对免疫器官指数的影响

组别	剂量 /(mg/kg)	脾指数 /(g/kg)	胸腺指数/(g/kg)
空白对照		8.77±2.46	2.24±0.39

环磷酰胺	20	5.05±1.81**	0.66±0.12**
二氧化氯（pH=5）	1（100ppm）	8.68±1.09	2.29±0.14
	5（500ppm）	9.73±2.14*	2.39±0.09*
	20（2000ppm）	9.96±1.09**	2.95±0.30**
二氧化氯制剂（（pH=3.5）	1（100ppm）	8.28±1.44	2.23±0.16
	5（500ppm）	9.22±2.02 *	2.70±0.83*
	20（2000ppm）	9.43±1.18 **	2.89±0.54**

*注：*P < 0.05，**P < 0.01 与空白对照组比。*

说明，本发明提供的酸性二氧化氯制剂对于肿瘤细胞具有明显的凋亡诱导作用，并且对机体几乎没有副作用。

权 利 要 求 书

1. 一种包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂。

2. 权利要求 1 的细胞凋亡诱导剂，其包含溶解在水中的二氧化氯，其中二氧化氯浓度为 500-2900ppm，基于质量计算。

3. 权利要求 2 的细胞凋亡诱导剂，其还含有酸性 pH 调节剂，使得该细胞凋亡诱导剂的 pH=1.5-6.5，所述酸性 pH 调节剂选自以下各集合中的至少一种：

有机酸或其盐，其选自由甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸、乙醇酸、富马酸、丙二酸、马来酸、草酸、琥珀酸、丙烯酸、巴豆酸、戊二酸和它们的盐组成的集合；

无机酸或其盐，其选自由盐酸、磷酸、硼酸、偏磷酸、焦磷酸、氨基磺酸、磷酸二氢盐、磷酸氢盐组成的集合。

4. 权利要求 3 的细胞凋亡诱导剂，其中所述酸性 pH 调节剂选自柠檬酸、乙酸或磷酸二氢盐。

5. 一种包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒，其包含以下两种独立的组分：

第一组分：二氧化氯前体固体，或包含二氧化氯前体的溶液；

第二组分：酸性 pH 调节剂的水溶液；

二者分开存放，且能在使用前进行混合，以现场反应并制得包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂；且第一组分和第二组分的量和浓度能够使得混合后的溶液的 pH=1.5-6.5；

其中所述二氧化氯前体选自亚氯酸钠、亚氯酸钾、亚氯酸锂、亚氯酸钙、亚氯酸镁或亚氯酸钡中的至少一种；

其中所述酸性 pH 调节剂选自以下各集合中的至少一种：

有机酸或其盐，其选自由甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸、乙醇酸、富马酸、丙二酸、马来酸、草酸、琥珀酸、丙烯酸、巴豆酸、戊二酸和它们的盐组成的集合；

无机酸或其盐，其选自由盐酸、磷酸、硼酸、偏磷酸、焦磷酸、氨基磺酸、

磷酸二氢盐、磷酸氢盐组成的集合。

6. 权利要求 1-4 中任一项的细胞凋亡诱导剂或权利要求 5 的包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒用于制备诱导细胞凋亡的药物的用途。

7. 权利要求 1-4 中任一项的包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂或权利要求 5 的包含二氧化氯的细胞凋亡诱导剂试剂盒用于制备治疗肿瘤的药物的用途，或者用于制备哺乳动物目标组织抗衰老药物的用途，或者用作化妆品的用途，或者用于制备化疗药物的用途。

8. 权利要求 7 的用途，其中所述肿瘤包括：颅内转移瘤、脑膜瘤、颅骨肿瘤、脑癌、脑垂体腺瘤、听神经鞘瘤、神经胶质瘤、脑肿瘤；上颌窦癌、喉癌、鼻咽癌、舌癌、甲状腺癌、牙龈癌、唇癌；胸腺瘤、肺癌、腺癌、乳房肉瘤、肺转移瘤、乳房纤维瘤、乳腺癌；胰头癌、胃癌、胆囊癌、直肠癌、胰腺癌、食管癌、结肠癌、肝癌；肾盂肿瘤、阴茎癌、尿路上皮癌、前列腺癌、尿道癌、睾丸癌、膀胱癌、肾母细胞瘤、肾癌；卵巢癌、输卵管肿瘤、外阴癌、阴道肿瘤、子宫癌、宫颈癌、绒毛膜癌、盆腔癌；皮肤癌、脂肪肉瘤、恶性畸胎瘤、纤维瘤、神经纤维瘤、黑色素瘤、胆管癌、鳞癌、基底细胞癌；脊索瘤、骨瘤、软骨瘤、骨肉瘤、滑膜肉瘤、骨巨细胞瘤、骨纤维肉瘤；急性白血病、恶性淋巴瘤、慢性白血病；肝血管瘤、胰岛细胞类癌、母细胞瘤、粘液瘤、颈部转移癌、贲门癌；独立地，

其中所述抗衰老药物包括预防记忆力下降、失眠、阿尔兹海默症、帕金森综合症、骨质疏松、糖尿病或心脑血管疾病的药物：独立地，

其中所述化妆品包括使皮肤美白、皮肤保水、减轻或消除皱纹、弹性增强、祛痘、祛斑、祛疤痕或使皮肤年轻化的化妆品。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/091047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/00 (2006.01) i; A61K 47/12 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 39/06 (2006.01) i; A61K 8/20 (2006.01) i; A61P 25/20 (2006.01) i; A61P 25/16 (2006.01) i; A61P 25/28 (2006.01) i; A61P 19/10 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61Q 19/08 (2006.01) i; A61Q 19/02 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P; A61K; A61Q

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

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

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, NCBI PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge: LIU, Xuewu; BEIJING WANBIN CELL BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; cell apoptosis, chlorine dioxide, cell apoptosis-inducer, tumor, cancer, anti-aging, cosmetics

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103720709 A (LIU, Xuewu), 16 April 2014 (16.04.2014), claims 1-8	1-8
X	LIU, Xuewu; "Essence of Aging-Model, Reason Anti-aging and Cancer", SCIENCEPAPER ONLINE, 27 January 2014(27.01.2014), page 8, lines 15-22, page 9, lines 5-10 and page 14, lines 1-5 and 4th line from the bottom	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 January 2015 (23.01.2015)	**30 March 2015 (30.03.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **TU, Haihua** Telephone No.: (86-10) **62413749**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/091047

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103720709 A	16 April 2014	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2014/091047

A. 主题的分类

A61K 33/00(2006.01)i; A61K 47/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 39/06(2006.01)i; A61K 8/20(2006.01)i; A61P 25/20(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 19/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61Q 19/08(2006.01)i; A61Q 19/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61P; A61K; A61Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, NCBI PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, 刘学武，北京万斌赛尔生物技术有限公司，二氧化氯，抗衰老，化妆品，肿瘤，癌症，细胞凋亡， chlorine dioxide, cell apoptosis-inducer, tumor, cancer, anti-aging, cosmetics

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103720709 A (刘学武) 2014年 4月 16日 (2014-04-16) 权利要求1-8	1-8
X	刘学武，. "衰老的本质-模型、原因、抗衰老和癌症，" 中国科技论文在线，, 2014年 1月 27日 (2014-01-27), 第8页第15-22行，第9页第5-10行，第14页第1-5行和倒数最后第4行	1-8

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 1月 23日	2015年 3月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	涂海华 电话号码 (86-10)62413749

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/091047

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 103720709 A	2014年 4月 16日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)