

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00806244.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年8月8日

[11] 授权公告号 CN 1330302C

[22] 申请日 2000.12.14 [21] 申请号 00806244.7

[30] 优先权

[32] 1999.12.15 [33] JP [31] 356267/99

[32] 2000.8.2 [33] JP [31] 234008/00

[86] 国际申请 PCT/JP2000/008839 2000.12.14

[87] 国际公布 WO2001/044488 日 2001.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.15

[73] 专利权人 株式会社氨基厄普化学

地址 日本札幌市

[72] 发明人 小砂宪一 袁 岚 三浦健人

孙步祥

[56] 参考文献

JP11-89589A 1999.4.6

CN1157171A 1997.8.20

CN1183475A 1998.6.3

JP1-258669A 1989.10.6

JP8-214787A 1996.8.27

CN1135223A 1996.11.6

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹 雯 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

来源于担子菌培养物的物质、其制造方法及其用途

[57] 摘要

一种新型物质，其制造方法，含有该物质的食品、饲料及药剂，该新型物质是用存在含异黄酮类材料的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌而得到的，它具有异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的生理活性，并被协同加强。本发明的物质增强了异黄酮类的糖苷配基所具有的生理活性作用和担子菌培养物的生理活性作用，不仅可作为抗肿瘤剂，而且可用作治疗和/或预防骨质疏松剂，作为免疫增强剂应用。

1. 一种具有生理活性作用的物质，它是用存在含异黄酮类材料的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌而得到的，其具有包括异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的生理活性；

在该物质中，糖质的含量为 75.0-85.0%，且每 1 克冷冻干燥粉末，异黄酮类的量为

异黄酮苷 0.00-0.60mg
大豆苷元 28.00-30.00mg
染料木苷 0.00-0.40mg
染料木黄酮 55.00-65.00mg
Glycitin 0.00-0.50mg
黄豆黄素 12.00-15.00mg,

该物质具有下列的生理学特性：1) 肿瘤细胞的增殖抑制作用，和 2) 肿瘤血管新生抑制作用。

2. 一种具有生理活性作用的物质，它是用存在含异黄酮类材料和 β -葡萄糖苷酶的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌而得到的，其具有包括异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的生理活性；

在该物质中，糖质的含量为 75.0-85.0%，且每 1 克冷冻干燥粉末，异黄酮类的量为

异黄酮苷 0.00-0.60mg
大豆苷元 28.00-30.00mg
染料木苷 0.00-0.40mg
染料木黄酮 55.00-65.00mg
Glycitin 0.00-0.50mg
黄豆黄素 12.00-15.00mg,

该物质具有下列的生理学特性：1) 肿瘤细胞的增殖抑制作用，和 2) 肿瘤血管新生抑制作用。

3. 权利要求 1 或 2 的物质，其中在所述的物质中有

- 1) 水分：30% 以下
- 2) 蛋白质：7.0-10.0%
- 3) 脂质：5.0-8.0%
- 5) 食物纤维：0.5-2.0%

6) 灰: 2.0-5.0%。

4. 权利要求 1 或 2 的物质, 它协同增加异黄酮类的糖苷配基的生理活性和担子菌培养物的生理活性。

5. 权利要求 1 或 2 的物质, 其中异黄酮类的糖苷配基为染料木苷。

6. 权利要求 1 或 2 的物质, 其中生理活性为抗肿瘤作用。

7. 权利要求 1 或 2 的物质, 其中肿瘤细胞增殖抑制作用为肿瘤细胞的编程死亡诱导作用。

8. 权利要求 1 或 2 的物质, 其中含异黄酮类材料为大豆种子, 来源于大豆种子的加工制品或竹芋根。

9. 权利要求 1 或 2 的物质, 其中具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌为灵芝菌或香菇菌。

10. 一种权利要求 1 或 2 的具有生理活性作用的物质的制造方法, 其特征是用存在含异黄酮类材料的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌, 得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

11. 上述权利要求 10 的具有生理活性作用的物质的制造方法, 它是预先培养担子菌, 提高 β -葡萄糖苷酶活性后, 将含异黄酮类材料加入培养基中进行培养, 得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

12. 上述权利要求 10 或 11 的制造方法, 其中含异黄酮类的材料为大豆种子, 来源于大豆种子的加工制品或竹芋根。

13. 一种权利要求 1 或 2 的具有生理活性作用的物质的制造方法, 其特征是用存在含异黄酮类材料和 β -葡萄糖苷酶的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌, 得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

14. 权利要求 10-11 任一项或权利要求 13 记载的具有生理活性作用的物质的制造方法, 其中异黄酮类的糖苷配基为染料木苷。

15. 权利要求 10-11 任一项或权利要求 13 记载的制造方法, 其中生理活性为抗肿瘤作用。

16. 上述权利要求 15 的制造方法, 其中抗肿瘤作用为肿瘤新生血管抑制作用。

17. 上述权利要求 15 的制造方法, 其中抗肿瘤作用为肿瘤细胞增殖抑制作用。

18. 上述权利要求 17 的制造方法, 其中肿瘤细胞增殖抑制作用为肿

瘤细胞的编程死亡诱导作用。

19. 上述权利要求 10 或 13 的制造方法，其中具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌为灵芝菌或香菇菌。

20. 一种健康食品，其含有上述权利要求 1-9 任一项记载的具有生理活性作用的物质。

21. 一种饲料组合物，其含有上述权利要求 1-9 任一项记载的具有生理活性作用的物质作为有效成分。

22. 一种抗肿瘤剂，其含有上述权利要求 1-9 任一项记载的具有生理活性作用的物质作为有效成分。

来源于担子菌培养物的物质、其制造方法及其用途

技术领域

本发明涉及具有抗肿瘤作用等生理活性的物质。更具体而言，本发明涉及能增强大豆等异黄酮类糖苷配基生理活性及担子菌培养物生理活性的新型物质，其制造方法及其作为健康食品组合物、动物或水产养殖用饲料组合物及抗肿瘤剂的用途。

背景技术

据报道，大豆和大豆加工制品的摄取可减轻癌症发生的风险，涉及预防原发性或化学物质诱导的癌症。这种作用归功于大豆所含的异黄酮。大豆异黄酮具有雌激素样作用，已证明它对乳腺癌、大肠癌、前列腺癌等癌、心血管疾病、脑功能异常、骨质疏松、酒精依赖症、更年期紊乱、高血脂症等具有广泛的预防性生理活性作用。

已知，大豆异黄酮有染料木苷 (genistin)、异黄酮苷 (daidzin)、glycitin 等。它们分别是以染料木黄酮 (genistein)、大豆苷元 (daidzein)、黄豆黄素 (glycitein) 为糖苷配基的葡萄糖糖苷。大豆异黄酮在大豆种子中以葡萄糖糖苷或其衍生物的形式存在。

大豆异黄酮的生理活性作用主要是基于糖苷配基的作用，葡萄糖糖苷形式的生理活性作用没那么强。这是由于糖苷状态下不易被小肠吸收。

分解大豆异黄酮糖苷，得到其糖苷配基的方法有几个提案。例如，通过大豆中 β -葡萄糖苷酶的作用而转换成糖苷配基的方法 (特开平 1-258669)；提取酱油饼或酱油汁中生成的异黄酮糖苷配基的方法 (特开平 5-170756)；让曲霉菌作用于大豆蛋白而得到含糖苷配体的异黄酮化合物的方法 (特开平 8-214787 号)；提取植物蛋白后，通过 β -葡萄糖苷酶或酯酶的作用而转化成糖苷配基的方法 (特表平 9-503781，美国特许第 5763389 号)；让微生物来源的酶作用于大豆胚轴而得到使所含异黄酮化合物糖苷配基化的方法 (特开平 11-89589 号)。

糖苷配基中，尤其是染料木黄酮具有抑制酪氨酸激酶、抑制 DNA

拓扑异构酶、抑制新血管生成的生理活性作用。但是，要达到抑制新血管生成的生理活性作用，血浆中染料木黄酮的浓度必须高，仅靠从肠道摄取染料木苷来满足染料木黄酮的必需量是很困难的，这是由于染料木苷是肠道难以吸收的糖苷。要达到充分的生理活性效果，必须摄取必要量糖苷配基形式的染料木黄酮。

另一方面，担子菌，如香菇和灵芝等等菌丝体及其培养物具有免疫增强活性和抗肿瘤作用等生理活性，一部分可用作抗癌剂。

近年来，这些抗癌剂多与具有肿瘤新生血管抑制作用的物质联合应用。这是由于联合应用对同一治疗目的发挥不同作用机制的物质预期可取得较高治疗效果。

已知具有肿瘤新生血管抑制作用的物质有，如以鲨鱼软骨作原料的粘多糖混合物和制管张素（angiostatin）等，其中一部分已实际应用。

肿瘤新生血管抑制作用是指阻碍或抑制增长的肿瘤产生血管新生促进物质，生成新血管，以供给自身增殖所必需的营养和氧分的作用。

肿瘤新生血管抑制物质是防止肿瘤细胞血管新生，抑制、阻碍其生长过度的物质，由于其施用可消除肿瘤，所以可用于癌症治疗。

肿瘤新生血管抑制物质可通过口腔摄取或静脉注射而发挥作用，但，目前能口服的物质很少。静脉注射的缺点是患者的负担大。

用于口服的鲨鱼软骨要达到肿瘤新生血管抑制作用，必须每天大量摄取大约 20 克以上，其缺点是由于它有鱼腥味和令人不快的味道很难摄取。为了抑制这种令人不快的腥味，赋予它在胃的强酸环境下不溶解，而保持到肠内，在肠内溶解、吸收的性质，将鲨鱼软骨粉碎制成微粉末状，再用油脂类和糖类等对该微粉末进行包衣等复杂处理。

另外，制管张素还没有实际应用。所以，需要能口服且安全性高的肿瘤新生血管抑制物质。

发明的公开

本发明的目的是解除以前技术的问题点，提供能增强担子菌培养

物的抗肿瘤作用等生理活性作用，并使大豆等异黄酮类的糖苷配基生理活性达到最佳的新型物质。

再者，本发明的目的是提供该新型物质的制造方法及该物质作为健康食品、动物或水产养殖用饲料及抗肿瘤剂的用途。

鉴于上述目的，本发明者们进行了广泛研究，结果在含有大豆种子和其加工制品等异黄酮类的材料（异黄酮类含有材料）存在下培养担子菌，通过担子菌产生的 β -葡萄糖苷酶的作用将葡萄糖糖苷的异黄酮（染料木苷等）分解成葡萄糖和糖苷配基（染料木黄酮等），使糖苷配基与培养担子菌而产生的物质一起蓄积在培养体系中，得到具有异黄酮类的糖苷配基的生理活性和担子菌培养物生理活性，且它们的生理活性比单独培养上述糖苷配基和担子菌培养物的混合物增强了的新型物质，从而完成了本发明。

也就是说，本发明涉及具有以下生理活性的物质，其制造方法，及应用该物质的健康食品组合物、动物或水产养殖用饲料组合物及抗肿瘤剂。

1) 一种具有生理活性作用的物质，它是用存在含异黄酮类材料的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌而得到的，其生理活性包括异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的生理活性。

2) 一种具有生理活性作用的物质，它是用存在含异黄酮类材料和 β -葡萄糖苷酶的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌而得到的，其生理活性包括异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的生理活性。

3) 上述1或2的物质，它协同增加异黄酮类的糖苷配基生理活性和担子菌培养物的生理活性。

4) 上述1-3任一项中的物质，其异黄酮类的糖苷配基为染料木黄酮。

5) 上述1-4任一项中的物质，其生理活性为抗肿瘤作用。

6) 上述5的物质，其抗肿瘤作用为肿瘤新生血管抑制作用。

7) 上述5的物质，其抗肿瘤作用为肿瘤细胞增殖抑制作用。

8) 上述7的物质，其肿瘤细胞增殖抑制作用为肿瘤细胞编程死亡诱导作用。

9) 上述1-4任一项中的物质，其中含异黄酮类的材料为大豆种

子，来源于大豆种子的加工制品或竹芋根。

10) 上述 1 或 2 的物质，其中具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌为灵芝菌或香菇菌。

11) 一种具有生理活性作用的物质的制造方法，其特征是用存在含异黄酮类材料的培养基培养具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌，得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

12) 上述 11 的具有生理活性作用的物质的制造方法，它是预先培养担子菌，提高 β -葡萄糖苷酶活性后，将含异黄酮类材料加入培养基中进行培养，得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

13) 一种具有生理活性作用的物质的制造方法，其特征是用存在含异黄酮类材料和 β -葡萄糖苷酶的培养基培养担子菌，得到含异黄酮类的糖苷配基和担子菌培养物的成分。

14) 上述 11-13 任一具有生理活性作用的物质的制造方法，其中异黄酮类的糖苷配基为染料木黄酮。

15) 上述 11-14 任一项中的制造方法，其中生理活性为抗肿瘤作用。

16) 上述 15 的制造方法，其中抗肿瘤作用为肿瘤新生血管抑制作用。

17) 上述 15 的制造方法，其中抗肿瘤作用为肿瘤细胞增殖抑制作用。

18) 上述 17 的制造方法，其中肿瘤细胞增殖抑制作用为肿瘤细胞编程死亡诱导作用。

19) 上述 11 或 12 的制造方法，其中含异黄酮类的材料为大豆种子，来源于大豆种子的加工制品或竹芋根。

20) 上述 11 或 13 的制造方法，其中具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌为灵芝菌或香菇菌。

21) 一种健康食品，它是具有上面 1-10 任一项中记载的生理活性作用的物质。

22) 一种饲料组合物，它是具有上面 1-10 任一项中记载的生理活性作用的物质。

23) 一种抗肿瘤剂，它是具有上面 1-10 任一项中记载的生理活

性作用的物质。

发明的详细说明

(本发明化合物的制造方法)

以下对本发明进行详细说明。

具有本发明生理活性作用的物质可用作为代表例的以下方法获得。

即，将担子菌接种到包含麦芽浸膏、酵母浸膏、纤维素、酒石酸铵等成分的培养基中，在一定条件下，培养到产生以 β -葡萄糖苷酶为代表的各种酶的酶活性增高阶段，加入大豆种子及其加工品等含异黄酮类的材料，在 β -葡萄糖苷酶活性增高的温度、pH条件下搅拌、通气培养，直到异黄酮糖苷基本上全部转化成糖苷配基后，将整个培养体系加热，使体系内的酶失活，终止反应，必要时通过冷冻干燥等手段进行干燥、粉末化，得到本发明的物质。

本发明中所使用的含异黄酮类的材料可直接使用大豆种子、脱脂大豆或它们适宜组织的一部分（表皮、胚乳、胚轴等），或应用水或酒精类或其混合物的抽提物。具体例可举出豆乳，用适宜手段从大豆种子分离出的异黄酮类可适宜使用。

本发明中的“异黄酮类”包含作为葡萄糖糖苷的异黄酮，丙二酰染料木苷、乙酰染料木苷等葡萄糖糖苷衍生物，及是葡萄糖糖苷的构成成分的糖苷配基，含有其中任一项的材料，均为“异黄酮类含有材料”。

本发明中，由大豆、脱脂大豆等制造的加工品，如豆酱、酱油、纳豆等加工品，均可作为异黄酮类含有材料使用，只要它们含有异黄酮就行。

除大豆之外，含有异黄酮类的植物有，如竹芋、红色三叶草、紫花苜蓿、*Lathyrus ugoensis*，荷兰笕、染料木等豆科植物类，或者用水、酒精类抽提这些含有异黄酮类植物的组织而得到的抽提液也可用作含有异黄酮类材料使用。特别使用是优选富含染料木黄酮的竹芋根。

本发明中应用的具有 β -葡萄糖苷酶活性的担子菌包括如下的担子菌。

埃杜香菇(*Lentinus edodes*)、透明灵芝(*Ganoderma lucidum*)、平盖灵芝(*Ganoderma applanatum*)、灰侧耳菌(*Pleurotus ostreatus*)、火菇菌(*Flammulina velutipes*)、*Pholiota nameko*、杂色革盖菌(*Coriolus versicolor*)、木耳(*Auricularia auricula*)、群交裂褶菌(*Schizophyllum commune*)、奇果菌(*Grifora umbellata*)、草菇小包脚菇(*Volvariella volvacea*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、*Albatrellus cofluens*、口蘑菌(*Tricholoma giganteum*)。

本发明中在含有异黄酮类材料的存在下培养上述担子菌。

除上述含有异黄酮类的材料之外，培养基中可添加其它各种碳源或氮源。碳源包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、蔗糖、上等白糖、黑糖、糖蜜、黑糖蜜、麦芽提取物等。

氮源包括，如肉汤、蛋白胨、谷蛋白餐、大豆粉、干燥酵母、酵母提取物、硫酸铵、酒石酸铵盐、尿素等。

此外，必要时可添加钠盐、镁盐、锰盐、铁盐、钙盐、磷酸盐等无机盐类和肌醇、维生素 B1 盐酸盐、L-精氨酸、生物素等维生素类。

培养可按照普通中温菌的培养进行，pH2-6, 10-45℃，优选在 15-30℃ 的温度下进行搅拌、通气培养。优选培养持续到将异黄酮糖苷基本上全部转换成糖苷配基。培养时间要根据细菌的量和异黄酮含有材料的形式而定，但通常为 4-20 天，优选 6-12 天。

培养终止后，给整个培养体系加热，使体系内的酶失活，终止反应。具有本发明生理活性的物质可为粉末状，通过将培养液和菌丝体的混和液浓缩干燥后进行粉碎处理而得到。可应用冷冻干燥法将之干燥后进行粉碎处理而得到微粉末。

本发明中可与上述担子菌一起联合应用β-葡萄糖苷酶制剂，增强担子菌的酶活性。

这一目的中使用的酶制剂包括曲霉菌属、芽孢杆菌属、根霉菌属等微生物来源的酶制剂，或以大豆、杏仁等植物为来源的酶制剂。应用大豆、杏仁等植物时，可直接应用这些种子的粉碎物。

担子菌培养基中异黄酮类含有材料的添加比率对异黄酮糖苷向糖苷配基和糖的转换量(染料木苷向染料木黄酮的转换)有很大的影响。

例如，大豆异黄酮制剂（含 40% 的异黄酮）与香菇菌一起，在含有麦芽提取物、酵母提取物的培养基中培养时，要得到向染料木黄酮的大量转换，向培养基中添加大豆制剂的适宜浓度为 3-10%，优选 5% 以下。

培养过程中由担子菌产生的 β -葡萄糖苷酶的活性变化对糖苷配基生成有很大影响。用与前面相同的培养基 10-60℃ 培养灵芝菌，观察 β -葡萄糖苷酶的活性变化和培养基 pH 变化。发现， β -葡萄糖苷酶的活性在 pH2.0-6.0 之间最高，温度在 40-70℃ 左右时，酶活性更高。

（药理活性）

推测本发明的生理活性物质不是已知具有抗肿瘤作用和免疫增强作用的培养担子菌而产生的生理活性物质与已知具有血管新生抑制作用的异黄酮类糖苷配基（染料木黄酮）的简单混和，而是二者以某种形式结合形成一体的物质，或者是培养过程中产生某种未知物质。其理由是仅培养担子菌得到的物质与染料木黄酮单纯混和得不到与本发明的物质相同的生理活性（肿瘤血管新生抑制作用）。

仅培养担子菌而生成的物质具有抗肿瘤作用和免疫增强作用，无肿瘤血管新生抑制作用。

本发明的物质干燥、粉末化以后是褐色粉末，具有独特深苦味和炒熟的黄豆面那样的香味。其化学成分分析结果和生理学特性如下所示（测定方法参照后面的实施例）。

（1）本发明物质的化学成分

- 1) 水分：30% 以下
- 2) 蛋白质：7.0-10.0%
- 3) 脂质：5.0-8.0%
- 4) 糖质：75.0-85.0%
- 5) 食物纤维：0.5-2.0%
- 6) 灰：2.0-5.0%
- 7) 异黄酮类（每 1 克冷冻干燥粉末）
 - 异黄酮苷 0.00-0.60mg
 - 大豆苷元 28.00-30.00mg
 - 染料木苷 0.00-0.40mg

染料木黄酮 55.00-65.00mg

Glycitin 0.00-0.50mg

黄豆黄素 12.00-15.00mg

(2) 生理学特性

1) 肿瘤细胞的增殖抑制作用：抑制小鼠黑素瘤细胞、小鼠大肠癌、小鼠肺癌细胞、小鼠血管内皮细胞、大鼠乳腺癌细胞、人前列腺癌细胞、人膀胱癌细胞等细胞的增殖。

2) 肿瘤血管新生抑制作用：抑制小鼠的肿瘤血管新生。

本发明物质的肿瘤血管新生抑制作用是象后面实施例所示的那样通过应用小鼠肿瘤细胞的体外 (in vitro) 及体内 (in vivo) 试验, 应用鸡蛋膜的离体 (ex ovo) 试验 (CAM法: 绒毛膜尿囊膜) 来确认的。

产业上利用的可能性

(用作药品)

根据本发明, 应用含异黄酮的廉价材料, 可容易制造安全且容易口服、具有优良生理活性作用的物质。

本发明的物质协同加强异黄酮类的糖苷配基具有的生理活性作用及担子菌的培养生产物所具有的生理活性作用, 根据实验确认得结果, 它不仅能用作癌症的治疗和/或预防剂 (抗肿瘤剂), 而且可用作骨质疏松、更年期紊乱、心血管疾患、脑功能障碍、酒精依赖症、高血脂的治疗和/或预防剂, 或作为免疫增强剂、雌性激素样物质应用。

另外, 由于本发明的物质以长期以来以用作食物的蘑菇和大豆等为原料, 所以即使大量摄取也不会有安全问题, 可用于增强上述异黄酮类的糖苷配基具有的生理活性作用及担子菌的培养生产物所具有的生理活性作用的动物或水产用养殖饲料及保健食品。

本发明的物质作为食品、药品时主要经口服用, 其摄取量因年龄、体重、症状、预期的治疗效果、施用方法等而异, 通常一个成年人每次施用 100mg-5g 左右 (用干燥物换算)。

施用本发明的物质时, 一般以片剂、丸剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、糖浆剂等应用。当制备颗粒、片剂化或糖浆剂、涂抹剂时, 必要时可

使用辅助物质（淀粉类、糊精、甜味剂、色素、香料等）。

实施本发明的最佳状态

以下用实施例和比较例对本发明进行说明，但本发明并不限于此。

实施例 1: 用存在异黄酮类含有材料的培养基培养担子菌 (1)

(1) 材料

a. 异黄酮类含有材料

含异黄酮 40% 的大豆制品（美国，AHD 公司制）。所含异黄酮成分（每 1 克制剂）如下：

异黄酮苷 80.25mg

大豆苷元 2.20mg

染料木苷 103.94mg

染料木黄酮 2.48mg

Glycitin 30.60mg

黄豆黄素 3.67mg

b. 担子菌

Amino Up 化学公司，25℃ 保存于麦芽提取物液体培养基中的透明灵芝菌 (*Ganoderma lucidum*)。

(2) 培养条件

a. 培养基

麦芽提取物 (Oriental 酵母公司) 10.00g

酵母提取物 (味之素公司) 1.25g

水 1.0 升 (L)

b. 培养方法

培养基高压灭菌后，4℃ 保存。将灵芝菌接种到该培养基 (pH5.5) 中，25℃、130rpm 振荡培养。培养期间，每 2 日测定培养液中 β -葡萄糖苷酶的活性。酶活性比培养开始时高时，将粉末大豆制品（异黄酮含有材料）以 2.5% 的浓度添加到培养基中，再继续培养。测定染料木黄酮和染料木苷含量，到染料木苷全部转换成染料木黄酮时，终止培养。培养终止后，将整个培养液在 121℃ 加热处理 30 分钟，终止酶反应并进行灭菌处理。接着冷冻干燥，制成粉末。

培养液中 β -葡萄糖苷酶的活性测定是,用 β -葡萄糖苷酶标准品(Oriental 酵母公司,来源于酵母),与对硝基酚- β -D-吡喃葡萄糖苷(Sigma公司)反应,测定400nm的吸光度。

培养液中异黄酮生产量的测定是,使用异黄酮标准品(染料木苷、染料木黄酮,Sigma公司),按照Franke, A. A. 等的方法(J. Agric. Food Chem. 42:1905-1913, 1994),用乙腈-水-醋酸(10/90/0.1 \rightarrow 40/60/0.1)从ODS柱(TSKgel-80Tm, 4.5x150mm)上洗脱(0.8ml/min),测定260nm的吸光度。

如上所得本发明的物质(发明物质1)为褐色微粉末,具有如下特性。在以下分析中,通过70 $^{\circ}$ C减压干燥法测定水分,用凯氏定氮法测定蛋白质,用酸分解法测定脂质,用酶-重量法测定食物纤维,用直接灰化法测定灰分,通过差值求出糖质。

a. 化学性质

- 1) 水分 0.7%
- 2) 蛋白质 8.0%
- 3) 脂质 6.25%
- 4) 糖质 80.6%
- 5) 食物纤维 1.0%
- 6) 灰分 2.7%
- 7) 异黄酮类(每1克干粉末)
 - 异黄酮苷 痕量
 - 大豆苷元 28.47mg
 - 染料木苷 痕量
 - 染料木黄酮 59.11mg
 - Glycitin 痕量
 - 黄豆黄素 13.53mg

b. 生理学特性

1) 肿瘤细胞增殖抑制作用(体外)

用B16/BL6小鼠黑素瘤细胞、Colon 26小鼠大肠细胞、SST-2大鼠乳腺癌细胞、T24人膀胱癌细胞及Du145人前列腺癌细胞进行肿瘤细胞增殖抑制作用。将实施例1的物质(发明物质1)悬浮到蒸馏水中高压灭菌,以100 μ g/ml-0.1 μ g/ml的连续浓度加到细胞中。用

溶解到 0.1%乙醇中的染料木黄酮标准品 (Sigma 公司) 作阳性对照。用含 10% FBS 的 DMEM 培养基将肿瘤细胞悬浮液调整到 $1-2 \times 10^6$ 孔, 37°C 培养 24 小时, 向其中加入发明物质 1 或染料木黄酮标准品, 再培养 48 小时。用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四溴化钠) 法, 用小平板读数器 (microplate reader) 测定细胞增殖。发明物质 1 对各种培养癌细胞的增殖抑制效果如表 1 所示, 以对未处理对照组肿瘤增殖的肿瘤抑制率表示。数值高, 这提示癌细胞的增殖抑制效果高。

表 1: 发明物质 1 对各种培养癌细胞增殖的抑制率 (%)

发明物质1浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	B-16	Colon 26	SST-2	Du145	T-24
12.5	53.7	11.4	39.6	27.0	4.3
25.0	72.0	48.7	36.2	60.0	31.2
50.0	78.5	78.3	52.9	85.5	77.9
100.0	86.4	78.8	61.3	87.4	98.5

从表 1 可以看出, 发明物质 1 以浓度依赖的方式抑制各种培养癌细胞的增殖, 具有较高的肿瘤细胞增殖抑制效果。

2) 血管内皮细胞增殖抑制试验 (体外)

在用 1% 明胶包被的 96 孔微量板中预培养小鼠脑血管内皮细胞 LE-1 细胞 24 小时, 用 $10-0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的发明物质 1 处理后, 再培养 24 小时。用 MTT 法检测细胞的增殖。如表 2 所示, 发明物质 1 以浓度依赖的方式抑制脑血管内皮细胞的增殖, 具有较高的增殖抑制效果。由此可以断定发明物质 1 具有血管内皮细胞增殖抑制作用, 即血管新生抑制作用。

表 2: 发明物质 1 对小鼠脑血管内皮细胞增殖的抑制率 (%)

发明物质1浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LE-1
12.5	52.4
25.0	63.5
50.0	67.6
100.0	76.9

3) 发明物质 1、染料木黄酮标准品及担子菌培养物对各种肿瘤细胞的 50% 增殖抑制浓度 (IC_{50}) 比较 (体外)

用 3LL 小鼠肺癌细胞、Colon 26 小鼠大肠癌细胞、PC3 人前列腺癌细胞、Du145 人前列腺癌细胞及 LNCaP 人前列腺癌细胞检测发明物质 1、染料木黄酮标准品 (Sigma 公司) 及担子菌培养物 (在与实施例 1 相同的条件下, 只培养担子菌而得到的产物) 对它们的 50% 增殖抑制浓度 (IC_{50})。

即, 将发明物质 1、染料木黄酮标准品及担子菌培养物悬浮到蒸馏水中高压灭菌, 以 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ - $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的连续浓度加到细胞中。用含 10% FBS 的 DMEM 培养基将肿瘤细胞悬浮液调整到 $1-2 \times 10^5$ 孔, 37°C 培养 24 小时, 向其中加入发明物质 1 或染料木黄酮标准品, 再培养 48 小时。用 MTT 法通过小平板读数器 (microplate reader) 测定细胞增殖。其结果如表 3 所示。数值低, 这提示低浓度可抑制培养癌细胞增殖的 50%。

表 3: 发明物质 1、染料木黄酮标准品、担子菌培养物对各种癌细胞的 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

	3LL	Colon 26	PC3	Du145	LNCaP
发明物质1	11.03	1.44	26.09	19.60	23.52
染料木黄酮标准品	31.79	51.22	35.77	55.28	69.40
担子菌培养物	>1000	3.32	>1000	>1000	377.78

如表 3 所示, 发明物质 1 对任一培养癌细胞均有较高的癌细胞增殖抑制效果。发明物质 1 对各种培养癌细胞增殖抑制的 IC_{50} 均显著低于染料木黄酮标准品及担子菌培养物中的任一种。该事实说明发明物质 1 完全不同于染料木黄酮标准品及担子菌培养物中的任一种。

发明物质 1 的肿瘤细胞增殖抑制作用是由于诱导了肿瘤细胞的编程死亡 (apoptosis)。将 50000 个 T24 细胞在小室玻片内培养 24 小时, 加入培养基以使发明物质 1 的浓度达 $200\mu\text{g}/\text{ml}$, 再培养 48 小时后, 固定玻片上的细胞, 用 TUNEL 染色试剂盒染色后, 可以清楚看到经发明物质 1 处理的癌细胞发生编程死亡。

4) 肿瘤细胞编程死亡诱导作用

为了在 DNA 水平确认发明物质 1 的肿瘤细胞编程死亡诱导作用，通过电泳检测发生编程死亡细胞的基因特异的 DNA 梯带。

方法：给 SHR/NCrj 大鼠（雄性，6 周龄）皮下接种 SST-2（人乳腺癌），确认肿瘤形成后，通过自由摄取施用 2 周含 1% 发明物质 1 的水，再经口强制施用含 10% 发明物质 1 的水 1 周。对照组自由摄取 3 周 0.05%NaHCO₃ 水溶液。其后，从肿瘤组织提取 DNA，电泳，检测 DNA 梯带。结果施用了发明物质 1 的组中可明确看到 DNA 梯带，这表明发明物质 1 在 DNA 水平诱导编程死亡。

另外，应用流式细胞仪来检测发明物质 1 对肿瘤细胞编程死亡的诱导作用，它是通过核 DNA 染色来分析施用了发明物质 1 的大鼠乳腺癌细胞生长、分裂及分化过程（细胞周期）中的细胞数。

细胞培养：将 10ml 用含 10% FBS（胎牛血清）的 DMEM 培养基培养的 SST-2 大鼠乳腺癌细胞（ 10×10^6 /ml）10ml 移到内径 10cm 的培养皿中培养 1 小时后，如下加入样品。

对照：DMSO（10 μ l，终浓度 0.1%以下）

发明物质 1 处理：以 100mg/ml 的浓度将发明物质 1 的溶解到 DMSO 中，取 10 μ l 加到 10ml 细胞培养液中。发明物质 1 的终浓度为 100 μ g/ml。添加样品后再培养 48 小时，培养终止后收集细胞，用 70% 乙醇将细胞悬浮液固定 24 小时。再悬浮到含 0.1%葡萄糖和 Rnase（100U/ml）的 PBS（磷酸缓冲生理盐水），室温 30 分钟。在进行流式细胞仪检测以前，用碘化丙锭（propidium iodide）（PI:50 μ g/ml）将细胞染色 10 分钟。用流式细胞仪分析经发明物质 1 处理的 SST-2 细胞的细胞周期。

其结果显示：经发明物质 1 处理的 SST-2 细胞，其细胞周期停止在 DNA 合成与细胞分裂的间隔期（G1 期）和向 DNA 合成期（S 期）过渡的时期（G1S 期），提示细胞不能进行 DNA 的合成。G1S 期的 DNA 含量由总体的 65.48%减少到 55.91%，经发明物质 1 处理的 SST-2 细胞的编程死亡由 1.94%增加到 5.20%。该结果表明，SST-2 细胞通过停止在 G1S 期诱导编程死亡。

大豆异黄酮类、染料木黄酮及担子菌提取物等诱导细胞编程死亡已经有报道（例如，Cancer Res. 58, 5231-38, 1998; Jpn. J. Cancer Res. 91, 164-173, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 944-

950, 1992; J. Nat. Prod. 1998, 61, 485-487), 但如前所述, 发明物质 1 明显不同于染料木黄酮及担子菌提取物, 发明物质 1 对癌细胞的编程死亡诱导作用由本发明者们初次发现。

5) 肿瘤血管新生抑制试验 (体外)

用双层小室 (double chamber) 法进行血管新生抑制试验。

本实验中, 在细胞培养皿中培养小鼠大肠癌细胞 Colon 26, 在其孔的内侧插入开了直径为 $8\mu\text{m}$ 的内孔, 内孔上铺被胶原胶, 在其上培养脑血管内皮细胞 LE-1。外侧孔内大肠癌细胞产生的血管内皮细胞刺激因子从内侧孔的底孔进行刺激, 形成新生血管。确认新生血管形成以后, 将发明物质 1 加到外侧孔, 再培养 3 天。培养后, 对胶原胶上的细胞进行拍照, 通过计算机进行图象处理, 用图象分析软件 NIH Image 来计算血管内皮细胞生成的管腔总长度以及内皮细胞数, 用对正常细胞管腔长度的比率计算出血管新生抑制率。结果如表 4 所示, 经发明物质 1 处理后, 新生血管大大消失。

表 4: 发明物质 1 的肿瘤血管新生抑制效果 (体外)

	细胞数	管腔长	血管新生抑制率 (%)
未处理细胞	22	1593	—
发明物质1	1	70	95.6

6) 肿瘤血管新生抑制试验 (体内)

用背部皮下法体内进行血管新生抑制试验。用小鼠大肠癌细胞 Colon 26 (1×10^7 细胞) 充满两面贴了孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜 (Millipore 公司) 的 Millipore 环, 接种到 BALB/c 小鼠背部皮下。每天强制经口施用 1 克发明物质 1, 小室移植后第 5 天摘出小室, 照相记录血管的分布。将照片输入到计算机, 用图象分析软件 NIH Image 进行绿色滤光片处理, 对血管分布进行数字化处理后, 用移植部位的血管面积来计算面积率。结果如表 5 所示。经肿瘤细胞处理的小鼠, Colon 26 诱导皮下血管的面积约为正常小鼠的 2 倍, 与此相对, 摄取了发明物质 1 的小鼠与正常小鼠没有差异, 这表明经口摄取发明物质 1 可显著抑制肿瘤血管新生。

表 5: 发明物质 1 的肿瘤血管新生抑制效果 (体内)

	面积	面积率 (%)
正常 (未处理)	3854	12.8
肿瘤细胞处理	7200	26.9
用发明物质1处理	3018	10.8

7) 血管新生抑制试验 (离体 (ex ovo))

通过应用鸡受精卵的 CAM 法 (chorioallantoic membrane) 进行离体血管新生抑制试验。这是观察卵黄膜上血管新生的方法, 可将血管新生抑制物质直接施用到卵黄上, 打开卵壳直接观察血管新生的抑制。将 10 日龄的鸡卵于 37℃、60% 湿度培养 3 天后, 把卵壳打开一小口, 用注射器吸出 3ml 的蛋清, 用防水胶带封口, 再在该孔的对侧打开 1.0×1.0cm 的洞, 确认胚胎中血管生成后将洞封闭, 再培养 3 天。其后, 将灭菌的发明物质 1 的磷酸缓冲生理盐水从该洞加到卵内, 再培养 4 天后, 打开卵壳, 拍照记录卵黄膜上的血管分布。将照片输入到计算机, 用图象分析软件 NIH Image 进行绿色滤光片处理, 对血管分布进行数字化处理后, 用移植部位的血管面积来计算面积率。结果如表 6 所示。经发明物质 1 处理的卵黄膜上分布的血管面积减少, 与正常卵相比其抑制率高达 86.4%, 这表明有血管新生抑制效果。

表 6: 发明物质 1 的血管新生抑制效果 (ex ovo)

	面积	面积率 (%)	抑制率 (%)
正常卵 (未处理)	87167	38.3	—
发明物质1处理	11862	5.2	86.4

实施例 2: 用存在异黄酮类含有材料的培养基培养担子菌 (2)

用下述原料, 在与实施例 1 同样的条件下进行培养, 得到本发明的物质 (发明物质 2)。

(1) 原料

a. 异黄酮类含有材料

将北海道产的整粒大豆（染料木苷 0.730mg/g, 染料木黄酮 0.041mg/g, 均为无水物换算）用自来水浸泡一晚，使之吸水，加入 10 倍量的水，100℃煮 30 分钟，除去固形物后的豆乳。异黄酮的含有量如下：

异黄酮的含有量 (μg/ml)

异黄酮苷 11.68

大豆苷元 2.51

染料木苷 45.22

染料木黄酮 3.51

Glycitin 5.62

黄豆黄素 11.33

b. 担子菌

Amino Up 化学公司，25℃保存于麦芽提取物琼脂培养基中的埃杜香菇菌（*Lentinus edodes*）。

（2）所得本发明物质（发明物质 2）与发明物质 1 一样是褐色微粉末，具有如下的化学、生理学特性（测定方法与实施例 1 相同）。

a) 化学特性

1) 水分：0.9%

2) 蛋白质：12.9%

3) 脂质：1.3%

4) 糖质：73.9%

5) 食物纤维：3.1%

6) 灰：7.9%

7) 异黄酮类（每 1 克冷冻干燥粉末）

异黄酮苷 痕量

大豆苷元 20.50mg

染料木苷 痕量

染料木黄酮 37.20mg

Glycitin 痕量

黄豆黄素 8.49mg

b) 生理学特性

用与实施例 1 相同的方法对发明物质 2 进行肿瘤细胞增殖抑制试

验（体外）、血管内皮细胞增殖抑制试验（体内）、肿瘤血管新生抑制试验（体外）、肿瘤血管新生抑制试验（体内）、血管新生抑制试验（离体）。结果如表 7-11 所示。

表 7: 发明物质 2 对各种培养肿瘤细胞的增殖抑制率（%）（体外）

发明物质2浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	B-16	Colon 26	SST-2	Du145	T-24
12.5	23.2	7.9	20.8	17.1	0.0
25.0	52.2	23.9	58.5	30.0	9.6
50.0	75.4	41.8	65.4	37.1	28.1
100.0	86.0	73.3	84.6	69.8	54.5

由表 7 可知发明物质 2 对各种培养的肿瘤细胞显示高的抑制率，这表明其癌细胞增殖抑制效果高。

表 8: 发明物质 2 对小鼠脑血管内皮细胞的增殖抑制率（%）

发明物质2浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LE-1
12.5	39.6
25.0	36.2
50.0	52.9
100.0	61.3

由表 8 可知发明物质 2 以浓度依赖方式高度抑制脑血管内皮细胞增殖，具有血管新生抑制作用。

表 9: 发明物质 2 对肿瘤血管新生抑制效果（体外）

	细胞数	管腔长	新生血管抑制率（%）
正常细胞（未处理）	22	1593	—
用发明物质2处理	16	1366	14.3

表 9 表明发明物质 2 处理后新生血管形成减少，具有高达 14.3%

的抑制率。

表 10: 发明物质 2 对肿瘤血管新生的抑制效果 (体内)

	面积	面积率 (%)
正常 (无处理)	3854	12.8
肿瘤细胞处理	7200	26.9
用发明物质2处理	2494	10.6

表 10 表明, 肿瘤细胞处理的小鼠中 Colon 26 诱导的皮下血管面积约为正常小鼠的 2 倍, 而施用了发明物质 2 的小鼠与正常小鼠相比无变化。这表明, 通过摄取发明物质 2 可抑制肿瘤血管新生。

表 11: 血管新生抑制效果 (ex ovo)

	面积	面积率 (%)	抑制率 (%)
正常细胞 (未处理)	97167	38.3	—
发明物质2处理	34300	14.8	61.3

表 11 表明, 经发明物质 2 处理的卵黄膜上分布的血管面积减少, 与正常卵相比, 显示了抑制率高达 61.3% 的血管新生抑制效果。

比较例: 担子菌单独培养物与染料木黄酮混合物的生理作用

使用与实施例 1 同样的灵芝菌作担子菌, 除省略添加异黄酮类含有材料外, 在与实施例 1 同样的条件下进行培养、冷冻干燥, 得到褐色粉末 (比较物质 1)。比较物质 1 的化学性质如下 (分析法与实施例 1 相同)。

化学性质

水分 1.6%

蛋白质 12.9%

脂质 1.6%

糖质 71.4%

食物纤维 3.8%

灰分 8.7%

然后将 94g 比较物质 1 分散到 1 升水中，加温到 60℃，加入 3g 染料木黄酮（Sigma 公司），继续搅拌 30 分钟，然后真空冷冻干燥，得到干粉末（比较物质 2）。

对发明物质 1、发明物质 2、比较物质 1 和比较物质 2 进行离体（ex ovo）血管新生抑制试验，用荷瘤小鼠进行体内抗肿瘤试验。离体血管新生抑制试验与实施例 1 同样进行，用荷瘤小鼠进行的体内肿瘤增殖抑制试验按如下方法进行。

将 B-16 黑素瘤细胞（ 1×10^5 细胞）接种到 C57/BL 小鼠皮下，分别以 5% 的浓度将发明物质 1、2 和比较物质 1、2 混和成粉末饲料，接种肿瘤的同时自由摄取 21 天。第 21 天摘除肿瘤，测定质量。

实验结果如表 12 和 13 所示。

表 12: 血管新生抑制效果的比较 (ex ovo)

	面积率 (%)	抑制率 (%)
对照 (未处理)	38.3	—
发明物质1	5.2	86.4
发明物质2	14.8	61.3
比较物质1	27.0	29.5
比较物质2	23.0	40.0

表 13: 荷瘤小鼠肿瘤增殖抑制效果的比较 (体内)

	肿瘤重量 (平均值g)	标准差	
对照 (未处理)	1.44	0.59	
发明物质1	0.28	0.32	与对照有显著性差异为0.1%以下
发明物质2	0.68	0.34	与对照有显著性差异为1%以下
比较物质1	1.35	0.56	与对照无显著性差异
比较物质2	0.83	0.59	同上

如表 12、13 所显示的那样，离体血管新生抑制试验效果和用荷瘤小鼠进行的体内肿瘤增殖抑制试验效果中，比较物质 1 和 2 与对照

无差异，而发明物质 1 和 2 有较高抑制效果。