

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103285047 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310209888. 5

A23L 1/305 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 05. 30

A61P 35/00 (2006. 01)

(71) 申请人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路 9
号北京市农林科学院植物保护环境保
护研究所

(72) 发明人 赵爽 刘宇 许峰 耿小丽
王兰青 王守现 陈杰 杨娟娟
尹昭坤

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245
代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

A61K 36/07 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

A23L 1/28 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

长根菇蛋白质提取物及其抗肿瘤的应用

(57) 摘要

本发明公开了长根菇蛋白质提取物及其抗肿
瘤的应用。该长根菇蛋白质提取物，按照包括如下
步骤的方法制备：1) 将长根菇子实体粉碎后用水
浸提，收集水溶性物质得到长根菇水溶性提取物；
2) 对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80%
的硫酸铵沉淀，收集沉淀，对所述沉淀用去离子水
透析后，得到所述长根菇蛋白质提取物。该长根菇
蛋白质提取物处理人肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌
MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞 72h 后，IC₅₀值
分别为 5 μg/mL, 7 μg/mL, 8 μg/mL，并且抑制率
均随时间延长和浓度的增加而增加；光镜下可观
察细胞凋亡形态的改变。

1. 长根菇蛋白质提取物在制备抗肿瘤产品或抗肿瘤细胞产品中的应用,所述长根菇蛋白质提取物,按照包括如下步骤的方法制备:

1) 将长根菇子实体粉碎后用水浸提,收集水溶性物质得到长根菇水溶性提取物;

2) 对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀,收集沉淀,对所述沉淀用去离子水透析后,得到所述长根菇蛋白质提取物。

2. 长根菇蛋白质提取物在制备抑制肿瘤细胞增殖产品中的应用,所述长根菇蛋白质提取物,按照包括如下步骤的方法制备:

1) 将长根菇子实体粉碎后用水浸提,收集水溶性物质得到长根菇水溶性提取物;

2) 对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀,收集沉淀,对所述沉淀用去离子水透析后,得到所述长根菇蛋白质提取物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于:所述肿瘤为实体肿瘤。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在于:所述实体肿瘤为肝癌、乳腺癌和 / 或肺癌;所述肿瘤细胞为肝癌细胞、乳腺癌细胞和 / 或肺癌细胞。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的应用,其特征在于:所述步骤 2)中,在 4℃对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的应用,其特征在于:所述用去离子水透析采用截留分子量为 3kDa 半透膜进行。

7. 长根菇蛋白质提取物,按照包括如下步骤的方法制备:

1) 将长根菇子实体粉碎后用水浸提,收集水溶性物质得到长根菇水溶性提取物;

2) 对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀,收集沉淀,对所述沉淀用去离子水透析后,得到所述长根菇蛋白质提取物。

8. 根据权利要求 7 所述的长根菇蛋白质提取物,其特征在于:所述步骤 2)中,在 4℃对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的长根菇蛋白质提取物,其特征在于:所述用去离子水透析采用截留分子量为 3kDa 半透膜进行。

长根菇蛋白质提取物及其抗肿瘤的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及长根菇蛋白质提取物及其抗肿瘤的应用。

背景技术

[0002] 长根菇(*Oudemansiella radicata*),又称长根奥德蘑、长根金线菌,从属担子菌门,层菌纲,伞菌目,白蘑科,金线菌属。该菇味道鲜美,柄脆可口,富含多糖、脂肪酸、蛋白质、氨基酸、矿物质元素等,有较高的食药用价值,目前对长根菇的栽培工艺,发酵工艺和贮存方法等有较多的研究。林勇对长根菇中的蛋白质进行了营养评价,结果显示,长根菇子实体中化学评分、氨基酸评分、生物价、营养指数等高于参比的大杯伞和虎奶菇,说明长根菇是一种具有开发前景的蘑菇。黄文探索了长根菇栽培的新技术,从栽培季节、营养基配方,发菌管理,出菇管理和采收等方面进行总结,该新技术的生物效率达80%。为研究野生长根菇的菌丝分离技术和人工驯化栽培技术,陈振妮等进行了多次试验,成功地分离到长根菇菌丝体,进行栽培试验并应用于生产,采用浅层静置培养的方法制作液体菌种,提高了经济效益。胡梅等采用静置培养的方法对长根菇液体菌种培养基进行了优化,采用价格低廉的原料,确定了培养长根菇的最佳配方,降低了生产成本。胡昌华等分析了各种营养因子对长根菇深层发酵的影响,确定了最适深层发酵条件,为今后生物反应器放大和工业化生产奠定了基础。刘招龙从植物激素方面来探讨对长根菇生长的影响。结果显示,6-BA浓度在1.0-1.5mg/1000ml,对长根菇的菌丝生长产量的提高有很好的促进作用,在实际生产中有一定的参考价值。在长根菇保藏工艺方面,真空冷冻干燥可以有效保留生物质的营养成分,在保证干燥品质的前提下,庞振凌等优化长根菇真空冷冻干燥的工艺参数组合,得到冷冻干燥的最优工艺参数,对于长根菇的实际干燥加工过程具有指导意义。

[0003] 目前对于长根菇的研究主要集中在发酵、栽培和营养分析的层面上,对于长根菇的药理活性研究还鲜见报道,从长根菇子实体中提取蛋白类物质体外抗肿瘤尚属空白。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的一个技术问题是提供具有抗肿瘤活性的长根菇蛋白质提取物。

[0005] 本发明所提供的长根菇蛋白质提取物,按照包括如下步骤的方法制备:

[0006] 1)将长根菇子实体粉碎后用水浸提,收集水溶性物质得到长根菇水溶性提取物;

[0007] 2)对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为80%的硫酸铵沉淀,收集沉淀,对所述沉淀用去离子水透析后,得到所述长根菇蛋白质提取物。

[0008] 上述步骤1)中,所述用水浸提可在2-6℃用水浸提10-14小时。所述水可为去离子水。

[0009] 所述长根菇子实体可为新鲜的子实体也可为干燥的子实体。所述干燥的子实体是将新鲜的长根菇子实体在常温(如20-25℃)下干燥得到的。

[0010] 所述新鲜长根菇子实体和水的体积比可为1:4-6,如1:4。

[0011] 上述步骤1)中,可采用离心收集所述水溶性物质。离心收集所述水溶性物质的离

心力可为 6000–15000g(如 12000g), 离心时间可为 10–20 分钟(如 15 分钟)。上述步骤 2) 中, 也可采用离心收集所述沉淀。离心收集所述沉淀的离心力可为 6000–15000g (如 12000g), 离心时间可为 10–20 分钟(如 15 分钟)。

[0012] 上述步骤 2) 中, 在 4°C 对所述长根菇水溶性提取物进行饱和度为 80% 的硫酸铵沉淀。

[0013] 上述步骤 2) 中, 所述用去离子水透析采用截留分子量为 3kDa 半透膜进行。

[0014] 上述制备方法还包括将透析后的半透膜内的液体在 3000–9000g (如 6000g), 离心 10–20 分钟(如 15 分钟), 收集上清液, 将该上清液进行冷冻干燥, 制备成长根菇蛋白质提取物干粉的步骤。

[0015] 本发明所要解决的另一个技术问题是提供上述长根菇蛋白质提取物的用途。

[0016] 本发明所提供的上述长根菇蛋白质提取物的用途, 为下述 A 或 B :

[0017] A、抗肿瘤或肿瘤细胞的产品(如药物、保健品和 / 或食品), 其活性成分为上述长根菇蛋白质提取物 ;

[0018] B、上述长根菇蛋白质提取物在制备抗肿瘤或肿瘤细胞的产品(如药物、保健品和 / 或食品) 中的应用。

[0019] 上述用途中, 所述肿瘤可为实体肿瘤。

[0020] 所述实体肿瘤可为肝癌、乳腺癌和 / 或肺癌 ; 所述肿瘤细胞可为肝癌细胞、乳腺癌细胞和 / 或肺癌细胞。所述肺癌可为肺腺癌, 所述肺癌细胞可为肺腺癌细胞。

[0021] 所述肝癌细胞可为人肝癌细胞, 如 HepG2 细胞 ; 所述乳腺癌细胞可为人乳腺癌细胞, 如 MCF-7 细胞 ; 所述肺癌细胞可为人肺腺癌细胞, 如 A-549 细胞。

[0022] 上文中, 所述长根菇具体可为长根菇(Oudemansiella radicata) CFCC89567。

[0023] 本发明的长根菇蛋白质提取物处理人肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞 72h 后, HepG2、MCF-7、A-549 细胞的增殖均明显受到抑制, 且 IC₅₀ 值分别为 5 μ g/mL, 7 μ g/mL, 8 μ g/mL, 并且抑制率均随时间延长和浓度的增加而增加 ; 光镜下可观察细胞凋亡形态的改变。说明长根菇蛋白质提取物对 HepG2、MCF-7、A-549 细胞均有显著的抑制增殖作用, 可用于制备抗肿瘤或肿瘤细胞的产品。

附图说明

[0024] 图 1 为 BCA 蛋白定量试剂盒制作标准曲线。

[0025] 图 2 为 MTT 法测定长根菇蛋白质提取物处理 HepG2 细胞 72h 后细胞凋亡情况。

[0026] 图 3 为 MTT 法测定长根菇蛋白质提取物处理 MCF-7 细胞 72h 后细胞凋亡情况。

[0027] 图 4 为 MTT 法测定长根菇蛋白质提取物处理 A-549 细胞 72h 后细胞凋亡情况。

[0028] 图 2– 图 4 中数据结果以平均数 ± 标准差表示(n=3), 经单因素方差分析, 其中 * 表示与 0 μ g/mL 组比较具有显著性差异(*P<0.05); 图 2 中, 0、2、4、6、8、10 分别表示 0 μ g/mL 组、2 μ g/mL 组、4 μ g/mL 组、6 μ g/mL 组、8 μ g/mL 组、10 μ g/mL 组 ; 图 2 下方的培养板从左至右的列依次为 0 μ g/mL 组、2 μ g/mL 组、4 μ g/mL 组、6 μ g/mL 组、8 μ g/mL 组、10 μ g/mL 组 ; 图 3 和图 4 中, 0、3、6、9、12、15 分别表示 0 μ g/mL 组, 3 μ g/mL 组, 6 μ g/mL 组, 9 μ g/mL 组, 12 μ g/mL 组, 15 μ g/mL 组 ; 图 3 和图 4 下方的培养板从左至右的列依次为 0 μ g/mL 组, 3 μ g/mL 组, 6 μ g/mL 组, 9 μ g/mL 组, 12 μ g/mL 组, 15 μ g/mL 组。

具体实施方式

[0029] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0030] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0031] 下述实施例中的长根菇(*Oudemansiella radicata*)CFCC89567，公众可从中国微生物菌种保藏管理委员会林业微生物中心(中国林业微生物菌种保藏管理中心，China Forestry Culture Collection Center 英文缩写 CFCC，简称林业微生物中心)获得。

[0032] 实施例 1、长根菇蛋白质提取物的制备

[0033] 1、制备长根菇子实体

[0034] 将长根菇(*Oudemansiella radicata*)CFCC89567 斜面菌种接种到一级种培养基中进行活化，25℃恒温培养，待菌丝长满试管后将其接种到二级种培养基中，25℃恒温培养室培养至菌丝长满，将二级种接种到装有栽培培养基的栽培袋中 25℃的条件下进行发菌，菌种长满栽培袋后进行搔菌并移入温室大棚，出菇条件保持湿度在 90% 以上，温度 17–28℃，收集第一潮子实体，得到长根菇(*Oudemansiella radicata*)CFCC89567 子实体。

[0035] 其中，该实验所用的培养基如下：

[0036] 一级种培养基：200g 马铃薯，20g 葡萄糖，20g 琼脂粉，3g KH₂PO₄，10mg 维生素 B₁，5g 蛋白胨，1.5g MgSO₄，1000mL 蒸馏水，经 121℃，30min 高压灭菌。

[0037] 二级种培养基：棉籽壳 80%，麸皮 18%，石膏 1%，糖 1%，料水比为 1:1，经 121℃，30min 高压灭菌。

[0038] 栽培培养基：棉籽壳 57%，玉米芯 20%，麸皮 20%，石灰 3%，料水比为 1:1。经 121℃，30min 高压灭菌。

[0039] 2、制备长根菇水溶性提取物

[0040] 用 4 倍体积的去离子水浸泡步骤 1 的新鲜长根菇(*Oudemansiella radicata*)CFCC89567 子实体 2 小时，利用组织捣碎机将混合物进行组织破碎至糊状，于 4℃浸提(即静置)12h 后，12000g 离心 15min，收集上清溶液，该上清溶液即为长根菇水溶性提取物。

[0041] 3、制备长根菇蛋白质提取物

[0042] 在 4℃向步骤 2 的长根菇水溶性提取物中加入 (NH₄)₂SO₄ 至 (NH₄)₂SO₄ 的饱和度为 80%，于 4℃条件下静置 4 小时，12000g 离心 15min，收集沉淀，对该沉淀进行透析。其中，透析采用的半透膜的截留分子量为 3kDa，沉淀在半透膜中在流动的自来水中透析 5h，再在去离子水中透析 12h。将透析后的半透膜内的液体在 6000g 离心 15min，收集上清液，将该上清液置于液氮中冷冻干燥 36 小时，得到长根菇蛋白质提取物，作为抑制肿瘤细胞增殖药物。

[0043] 实施例 2、长根菇蛋白质提取物抑制肿瘤细胞增殖实验

[0044] 1.1 供试细胞株

[0045] 人肝癌 HepG2 细胞(购自美国 ATCC)、人乳腺癌 MCF-7 细胞(购自美国 ATCC)和人肺腺癌 A-549 细胞(购自美国 ATCC)。

[0046] 1.2 实验方法

[0047] 1.2.1 细胞系及细胞培养

[0048] 人肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞按照常规培养方

法进行活化和传代。其中,人肝癌 HepG2 细胞的传代和活化培养基是 DMEM- 高糖 +1% 双抗 +10%FBS (在 DMEM- 高糖 (Hyclone, SH30022. 01B) 中加入青霉素和链霉素混合液(青霉素 10000U/mL、链霉素 10000 μg/mL) 和胎牛血清(FBS, Hyclone, SV30087. 02),使前两者最终体积百分含量为 1%, FBS 的体积百分含量为 10% 得到的培养液)。人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞的传代和活化培养基是 RPMI1640+1% 双抗 +10%FBS (在 RPMI1640 (Invitrogen, 11875-093) 中加入青霉素、链霉素混合液和胎牛血清(FBS),使前两者最终体积百分含量为 1%, FBS 的体积百分含量为 10% 得到的培养液)。

[0049] 1. 2. 2 细胞活性检测

[0050] 采用噻唑蓝比色法(MTT)检测实施例 1 的长根菇蛋白质提取物对人肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞的抑制活性,具体方法如下:

[0051] 本实验选用步骤 1. 2. 1 的 P8 代(第 8 代)细胞,以每孔 7×10^3 个 /mL 细胞接种于 96 孔板中,待细胞完全贴壁后,随机选 18 孔细胞分为 6 组,一个对照组和 5 个实验组,每组三孔细胞。人肝癌 HepG2 细胞的 6 组分别为 0 μg/mL 组(对照组)、2 μg/mL 组、4 μg/mL 组、6 μg/mL 组、8 μg/mL 组、10 μg/mL 组。人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞的 6 组均分别为 0 μg/mL 组(对照组),3 μg/mL 组,6 μg/mL 组,9 μg/mL 组,12 μg/mL 组,15 μg/mL 组。0 μg/mL 组的每孔细胞中加入 200 μL 无血清培养液,2 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 2 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液,3 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 3 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液,4 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 4 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液,6 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 6 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液,8 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 8 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液;9 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 9 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液;10 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 10 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液;12 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 12 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液;15 μg/mL 组每孔加入 200 μL 长根菇蛋白质提取物浓度为 15 μg/mL 的含长根菇蛋白质提取物培养液。加完培养液在 37°C 培养 72h 后,每孔加入 200 μL MTT 工作液(无菌水配制的 5mg/mL MTT 溶液:无血清培养液 =1:9 (体积比)避光继续培养 4h,小心吸弃孔内的细胞培养液,每孔加 200 μL DMSO (二甲基亚砜),震荡孵育 10min,使结晶物充分融解。用酶标仪在 560nm 波长处测吸光度,以对照组的细胞存活率为 100%,计算实验组细胞的存活率:实验组细胞存活率 =OD (实验组)/OD (对照组) %。各组细胞的凋亡率 =100%- 各组细胞的存活率。实验重复三次。

[0052] 试验所有数据采用 SPSS12. 0 (SPSS Inc., USA) 统计软件的独立样本 t 检验处理统计。根据各组细胞的凋亡率计算长根菇蛋白质提取物对每种癌细胞的 IC50 值(使癌细胞的凋亡率为 50% 的含长根菇蛋白质提取物培养液中长根菇蛋白质提取物浓度)。

[0053] 其中,人肝癌 HepG2 细胞的无血清培养液是 DMEM- 高糖 +1% 双抗 ;2 μg/mL 组、4 μg/mL 组、6 μg/mL 组、8 μg/mL 组、10 μg/mL 组中每孔加入的含长根菇蛋白质提取物培养液分别是向 DMEM- 高糖 +1% 双抗中加入长根菇蛋白质提取物母液得到的长根菇蛋白质提取物浓度分别为 2 μg/mL、4 μg/mL、6 μg/mL、8 μg/mL、10 μg/mL 的液体。DMEM- 高糖 +1% 双抗是在 DMEM- 高糖 (Hyclone, SH30022. 01B) 中加入青霉素和链霉素混合液(青霉素 10000U/

mL、链霉素 10000 μg/mL) 使二者最终体积百分含量为 1% 的无血清培养液。

[0054] 人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞的无血清培养液是 RPMI1640+1% 双抗 ;3 μg/mL 组, 6 μg/mL 组, 9 μg/mL 组, 12 μg/mL 组, 15 μg/mL 组中每孔加入的含长根菇蛋白质提取物培养液分别是向 RPMI1640+1% 双抗中加入长根菇蛋白质提取物母液得到的长根菇蛋白质提取物浓度分别为 3 μg/mL, 6 μg/mL, 9 μg/mL, 12 μg/mL, 15 μg/mL 的液体。RPMI1640+1% 双抗是在 RPMI1640 (Invitrogen, 11875-093) 中加入青霉素和链霉素混合液 (青霉素 10000U/mL、链霉素 10000 μg/mL) 使二者最终体积百分含量为 1% 的无血清培养液。

[0055] 上述长根菇蛋白质提取物母液均是用各种细胞的相应无血清培养液溶解实施例 1 制备的长根菇蛋白质提取物, 配制成蛋白质含量为 100 μg/ml 的长根菇蛋白质提取物水溶液。

[0056] 其中, 长根菇蛋白质提取物水溶液中蛋白质含量的测定方法如下 :

[0057] 1) 标准曲线的制作 :利用标准样品小牛血清蛋白 (BSA) 配置成不同浓度的蛋白溶液, 采用 BCA (北京博迈德科技公司) 蛋白定量试剂盒制作标准曲线 (图 1)。

[0058] 2) 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定长根菇蛋白质提取物水溶液中蛋白质含量, 该蛋白质含量即为长根菇蛋白质提取物水溶液中长根菇蛋白质提取物浓度。

[0059] 2 实验结果及分析

[0060] 2.1 长根菇蛋白质提取物抗肿瘤活性检测结果

[0061] MTT 法测定结果表明, 实施例 1 的长根菇蛋白质提取物对三株癌细胞均有抑制作用, 抑制率均表现出剂量依赖性, 与对照组相比, 随着长根菇蛋白质提取物浓度的增加, HepG2 细胞、MCF-7 细胞和 A-549 细胞的凋亡率均增高, 且 IC₅₀ 值分别为 5 μg/mL, 7 μg/mL, 8 μg/mL; 光镜下可观察到细胞凋亡形态的改变。具体抑制效果见表 1、表 2 和图 2-4。

[0062] 表 1. 长根菇蛋白质提取物对人肝癌 HepG2 细胞的体外抑制率

[0063]

	癌症细胞的凋亡率						IC ₅₀ 值 μg/mL
	0 μg/mL 组	2 μg/mL 组	4 μg/mL 组	6 μg/mL 组	8 μg/mL 组	10 μg/mL 组	
HepG2	0	11%	33%	82%	90%	96%	5

[0064] 表 2. 长根菇蛋白质提取物对人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肺腺癌 A-549 细胞的体外抑制率

[0065]

	癌症细胞的凋亡率						IC ₅₀ 值 μg/mL
	0 μg/mL 组	3 μg/mL 组	6 μg/mL 组	9 μg/mL 组	12 μg/mL 组	15 μg/mL 组	
MCF-7	0	12%	42%	76%	82%	88%	7
A-549	0	7%	41%	63%	78%	92%	8

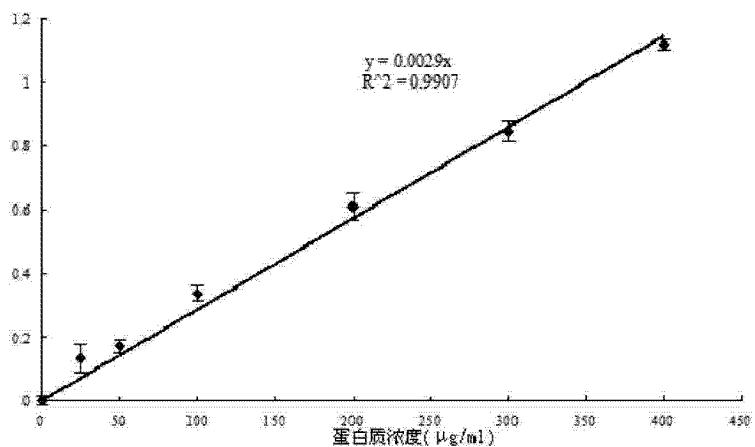


图 1

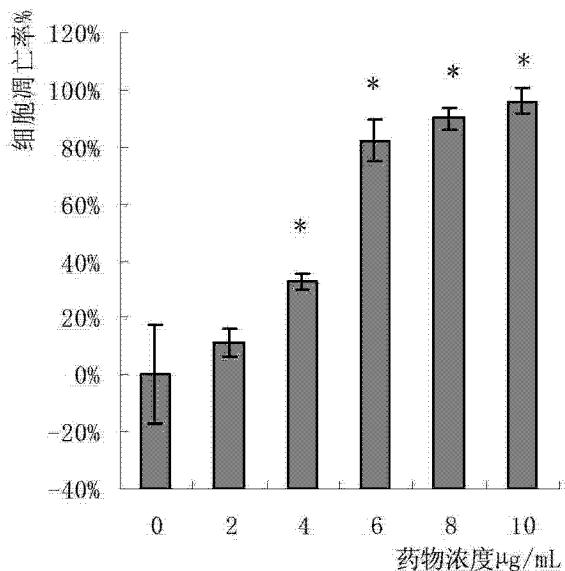


图 2

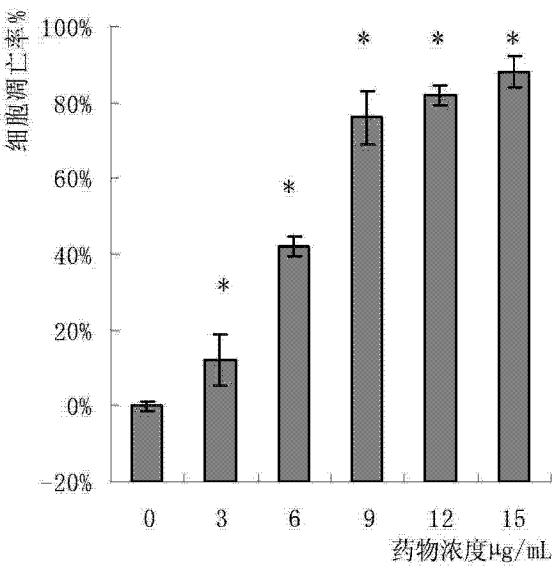


图 3

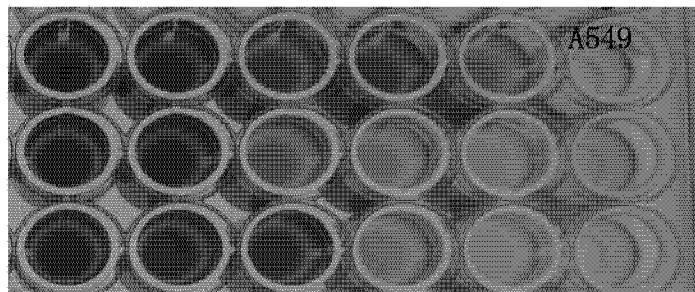
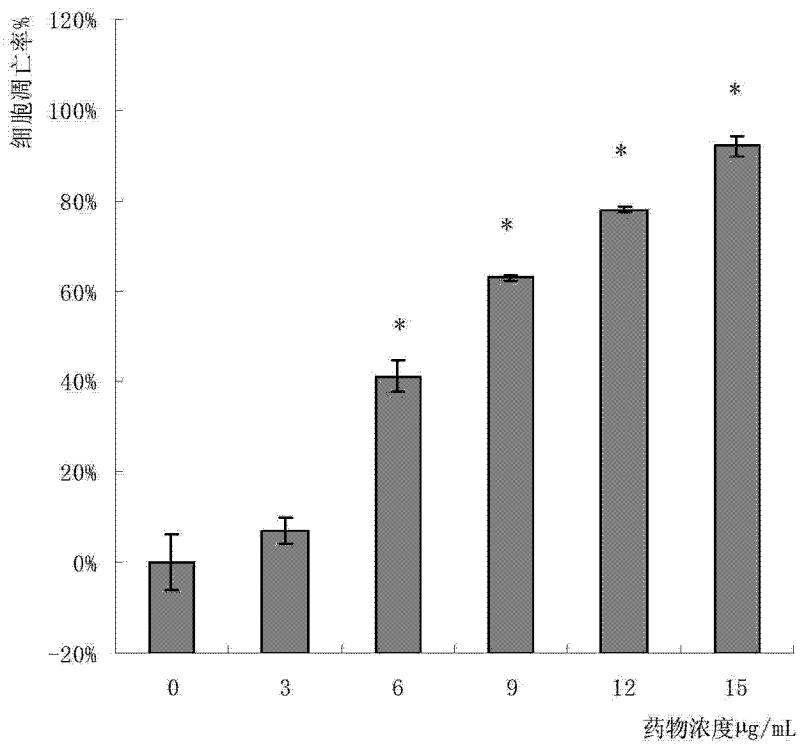


图 4