[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C08B 37/00
C12P 19/04
A61K 31/715

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03118416.2

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1205231C

[22] 申请日 2003.1.6 [21] 申请号 03118416.2
[71] 专利权人 武汉大学
地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山
[72] 发明人 张俐娜 陈 莉 金 勇 林雨露
张 玫 张志强
审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 武汉天力专利事务所
代理人 程 祥 冯卫平

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 一种具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明公开了具有抗肿瘤活性的人工培养菌种的茯苓菌丝体水溶性杂多糖及其制备方法和用途。用玉米浆为主要成分配制成培养基，由茯苓菌种深层发酵培养出茯苓菌丝体。分别用生理盐水和热水从菌丝体中提取水溶性杂多糖。所得该杂多糖主要由 α－D－葡萄糖、甘露糖、半乳糖和蛋白质组成。体内活性实验表明，该水溶性杂多糖对植入小鼠体内的 Sarcoma 180 肿瘤的生长具有明显的抑制作用，而且无毒副作用。体外活性实验表明，该类多糖对人体急性白血病毒细胞（HL－60）的增殖有显著的抑制效果，而且不会破坏正常猴肾细胞的增殖。上述水溶性杂多糖可用作抗肿瘤药物或提高机体免疫功能的保健品。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1．一种具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖，由下法制得：采用中国科学院微生物所菌种保藏中心提供的、编号 5.78 的人工培育的茯苓菌种（*Poria cocos*）在含玉米浆的液体培养基中深层发酵培养出茯苓菌丝体，将茯苓菌丝体依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取去除脂肪；然后浸泡在生理盐水中，离心，离心后所得沉淀用 105～120℃的热水在 0.12~0.20 MPa 下浸泡提取，离心，收集提取液；提取液浓缩后，用 H_2O_2 脱色，用 Sevag 法除去游离的蛋白质直至紫外检测无 280nm 的蛋白质吸收峰，然后透析、冷冻干燥得水溶性杂多糖纯品。

2．权利要求 1 所述水溶性杂多糖的制备方法，其特征在于：采用中国科学院微生物所菌种保藏中心提供的、编号 5.78 的人工培育的茯苓菌种（*Poria cocos*）在含玉米浆的液体培养基中深层发酵培养出茯苓菌丝体，将茯苓菌丝体依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取去除脂肪；然后浸泡在生理盐水中，离心，离心后所得沉淀用 105～120℃的热水在 0.12~0.20 MPa 下浸泡提取，离心，收集提取液；提取液浓缩后，用 20wt%~30wt%H_2O_2 脱色，用 Sevag 法除去游离的蛋白质直至紫外检测无 280nm 的蛋白质吸收峰，然后透析、冷冻干燥得多糖纯品。

3．根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述培养基的基本组成为 1L 蒸馏水含玉米浆 5～15mL、D-葡萄糖 20～30g、酵母膏 3～3.5g、KH2PO4 0.8～1.2g、CaCl2·2H2O 0.04～0.08g、MnCl2·4H2O 3～7mg、MgSO4·7H2O 0.3～0.7g、ZnCl2 2～6mg、Fe2 (SO4) 3 3～7mg、维生素 B1 0.08～0.12mg。

4．根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其特征在于：上述茯苓菌丝体索氏提取去除脂肪时间在 4～8 小时，其在生理盐水中的提取时间在 8～12 小时；透析时间在 5～10 天。

5．权利要求 1 所述的水溶性杂多糖在制备抗肿瘤药物中的用途。

6．权利要求 1 所述的水溶性杂多糖在制备提高机体免疫功能的保健品中的用途。

一种具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖及其制备方法和用途。属于天然高分子领域，也属于分子生物学领域。

背景技术

七十年代，由于细胞膜的化学功能、免疫物质和新药等研究方面取得的进展，以及多种糖蛋白、糖脂等复合多糖的发现，已确信多糖具有许多方面的生物活性。Chihara（J. Immunol. Immunopharmacol., IV, 85, 1983）的研究认为多糖类化合物的活性不是象在化疗中那样直接杀死细胞，而是存在一种间接的抗肿瘤活性，即由免疫系统传递的活性，主要是对免疫系统的特定非特异性或特异性功能的激发，因此毒性极小。茯苓是我国的传统中药，具有利尿、渗湿、补脾、安神等功能。近年来，茯苓的研究主要集中在其主要成分茯苓多糖上，它和它的衍生物具有抗诱变、抗肿瘤（Yakugaku Zasshi, 106, 206, 1986）和免疫（Phytother. Res., 9, 448, 1995）等活性。Narui等人（Carbohydr. Res. 87, 161, 1980）报道从茯苓菌核中提取的多糖具有明显的抗肿瘤活性。然而，由于茯苓人工栽培周期长，而且很难保存及运输，使得由菌核制得的茯苓多糖难以推广。

发明内容

本发明所要解决的问题是提供一种具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖及其制备方法和用途，这种杂多糖以容易获得的人工培育的茯苓菌种为原料，其制法简单，易以工业化生产。

为实现上述目的，本发明所采用的技术方案如下：一种具有抗肿瘤活性的水溶性杂多糖（ac-PCM2），由下法制得：采用人工培育的茯苓菌种（*Poria cocos*；中国科学院微生物所菌种保藏中心提供，编号 5.78）在含玉米浆的液体培养基中深层发酵培养出茯苓菌丝体，将茯苓菌丝体依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取去除脂肪；然后浸泡在生理盐水中，离心，离心后所得沉淀用 105～120℃的热水在 0.12~0.20 MPa 下浸泡提取，离心，收集提取液；提取液浓缩后，用 H_2O_2 脱色，用 Sevag 法除去游离的蛋白质直至紫外检测无 280nm 的蛋白质吸收峰，然后逆向流水透析，最后冷冻干燥得水溶性杂多糖纯品。

上述水溶性杂多糖主要由α-D-葡萄糖、甘露糖、半乳糖和蛋白质组成。其中含蛋白质 18.1%，多糖 81.9%（多糖中α-D-葡萄糖占 51.4%、半乳糖占 29.7%、甘露糖占 19.1%、岩藻糖占 0.8%），重均分子量为 17.0×10^4。以上均为重量百分比。

本发明还提供了上述水溶性杂多糖的制备方法，采用人工培育的茯苓菌种（*Poria cocos*；中国科学院微生物所菌种保藏中心提供，编号 5.78）在含玉米浆的液体培养基中深层发酵培养出茯苓菌丝体，将茯苓菌丝体依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取去除脂肪；然后浸泡在生理盐水中，离心，离心后所得沉淀用 105～120℃的热水在 0.12~0.20 MPa 下浸泡提取，离心，收集提取液。提取液浓缩后，用 20%~30%（重量百分比）H_2O_2 脱色，用 Sevag 法除去游离的蛋白质直至紫外检测无 280nm 的蛋白质吸收峰，然后透析、冷冻干燥得所需水溶性杂多糖（ac-PCM2）纯品。

上述培养基的基本组成为 1L 蒸馏水含玉米浆 5～15mL、D-葡萄糖 20～30g、酵母膏 3～3.5g、KH_2PO_4 0.8～1.2g，$CaCl_2·2H_2O$ 0.04～0.08g，$MnCl_2·4H_2O$ 3～7mg、$MgSO_4·7H_2O$ 0.3～0.7g、$ZnCl_2$ 2～6mg、$Fe_2(SO_4)_3$ 3～7mg、维生素 B_1 0.08～0.12mg、蒸馏水 1L。

上述茯苓菌丝体索氏提取去除脂肪时间在 4～8 小时，其在生理盐水中的提取时间在 8～12 小时；透析时间在 5～10 天。

上述水溶性杂多糖在制备抗肿瘤药物或提高机体免疫功能的保健品中的用途。

用红外光谱、核磁共振、气相色谱、蛋白质分析仪、粘度计及光散射仪确定了上述水溶性杂多糖化学组成和二级结构。

该水溶性杂多糖对植入小鼠体内的Sarcoma 180肿瘤抑制率的结果其抗肿瘤活性明显高于其它杂多糖，且无毒副作用，可用作保健品，作为抗肿瘤天然药物也具有应用前景。

与已有技术相比较，本发明的创新如下：所提供的茯苓菌丝体水溶性杂多糖为一种结构清楚的全新物质，它具有明显的抗肿瘤活性，且无毒副作用。这种茯苓菌丝体杂多糖可望成为有开发前景的抗肿瘤药物或提高机体免疫功能的保健品。该多糖的制备方法是培养基中采用廉价的玉米浆为主要原料，利用生物工程发酵技术培养茯苓菌丝体，并从中分离出具有抗肿瘤活性的多糖。它比用麸皮为主要原料的培养基得到的菌丝体多糖具有更显著的抗肿瘤活性。不同培养基得到的菌丝体多糖其化学组成、蛋白质含量和分子量均不同，因此影响到生物活性的不同。本发明制法简单，易以工业化生产。

具体实施方式

以下结合具体的实例对本发明的技术方案作进一步说明：

实施例

茯苓菌种为中国科学院微生物所菌种保藏中心提供，编号5.78（公众可随时购买）。首先在斜面培养基中培养菌种。培养用的试管以及棉塞先在121℃消毒灭菌30分钟（空消），再装入培养基在121℃消毒灭菌30分钟，斜放冷却使其凝固成斜面，然后在无菌室接种。斜面培养在恒温28℃下进行，为期7天。液体培养基配方如下：1L蒸馏水中含玉米浆（10mL），D-葡萄糖（25g），酵母膏（3.2g），KH_2PO_4（1.0g），$CaCl_2·2H_2O$（0.06g），$MnCl_2·4H_2O$（5mg），$MgSO_4·7H_2O$（0.5g），$ZnCl_2$（4mg），$Fe_2(SO_4)_3$（5mg），维生素B_1（0.1mg）。培养用的摇瓶（250mL）和棉塞事先在121℃消毒灭菌30分钟，装入液体培养基后再在121℃消毒灭菌30分钟，冷却后在无菌室接种。静置一天后将摇瓶置于摇床上，于25±1℃条件下震荡培养12天。所得菌丝体为浅黄色，且有一种淡香味。

将茯苓菌丝体从培养基中过滤分离后，经冷冻干燥得到的粉末依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取各8小时。然后用9 g/L 氯化钠水溶液提取三次：浸泡在9 g/L 氯化钠水溶液中过夜，离心，收集上清液（ac-PCM1）。残渣用热水于高压120℃下提取三次，每次半小时，离心，收集上清液（ac-PCM2）。提取液浓缩后，均用30%（重量百分比）H_2O_2脱色，用Sevag法除去游离的蛋白质，反复进行9次直至紫外检测无280nm处的吸收峰，然后分别用清水和二次蒸馏水透析5天和3天，浓缩，最后冷冻干燥得多糖纯品。茯苓菌丝体培养液过滤，浓缩后用30% H_2O_2脱色，用Sevag法除去游离的蛋白质，反复进行9次直至紫外检测无280nm处的吸收峰，然后分别用清水和二次蒸馏水透析5天和3天，浓缩，最后冷冻干燥得胞外多糖（ac-PCM0）。所得多糖均为浅黄色粉状固体。

对照组液体培养基配方为：1L蒸馏水中含麸皮（200g）的提取液，D-葡萄糖（25g），酵母膏（3.2g），KH_2PO_4（1.0g），$CaCl_2{\cdot}2H_2O$（0.06g），$MnCl_2{\cdot}4H_2O$（5mg），$MgSO_4{\cdot}7H_2O$（0.5g），$ZnCl_2$（4mg），$Fe_2(SO_4)_3$（5mg），维生素B_1（0.1mg）。菌丝体培养方法和茯苓菌丝体水溶性杂多糖提取方法同ac-PCM0和ac-PCM1上。所得多糖为浅黄色固体粉末分别命名为：ab-PCM0和ab-PCM1。

这些多糖的组成、蛋白质含量、分子量以及产率列于附表1，多糖样品经香港中文大学生物系对植入Sarcoma 180肿瘤小鼠进行体内腹腔注射试验，得出抗肿瘤活性结果列于附表2。由此表明由含玉米浆培养基培养的菌丝体多糖ac-PCM2具有明显的抗肿瘤活性。同时对本发明的水溶性杂多糖进行人体急性白血病毒细胞（HL-60）的抗增殖实验结果表明其对增殖有显著的抑制效果，而不会破坏正常猴肾细胞的增殖。该多糖可用于制备抗肿瘤药物和提高机体免疫功能的保健品。

附表1. 茯苓菌丝体多糖单糖组成、蛋白质含量、产率和分子量

样品	多糖中单糖含量 (%)						蛋白质（%）	产率（%）	$M_w\times10^{-4}$ ($g\ mol^{-1}$)
	岩藻糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	半乳糖	葡萄糖			
ac-PCM0	1.4	1.0	-	43.0	27.4	27.2	25.5		10.1
ac-PCM1	4.5	-	+	15.8	23.9	53.4	42.9	1.7	12.5
ac-PCM2	0.8	-	-	19.1	29.7	51.4	18.1	1.7	17.0
ab-PCM0	-	8.3	10.0	19.4	11.5	50.6	11.6		7.7
ab-PCM1	-	3.8	2.5	10.0	26.3	49.9	-	1.5	5.2

-: 未检测到; +: 痕量

附表 2. 茯苓菌丝体多糖的抗肿瘤活性

	样品	剂量 (mg/kg×days)	抑制率(%)	完全抑制
实例	ac-PCM0	20×10	-	0/7
	ac-PCM1	20×10	12.7	1/7
	ac-PCM2	20×10	42.3*	0/7
比较组	ab-PCM0	20×10	8.33	0/8
	ab-PCM1	20×10	4.17	0/8

- 对小鼠体内的 Sarcoma 180 肿瘤的生长没有明显的抑制作用

* $p < 0.01$