



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104152520 B

(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201410370731.5

C07K 1/34(2006.01)

(22)申请日 2014.07.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 101225102 A, 2008.07.23, 权利要求1、说明书第1页第2段和倒数第2段。

申请公布号 CN 104152520 A

WO 2011100829 A1, 2011.08.25, 全文。

(43)申请公布日 2014.11.19

CN 103497985 A, 2014.01.08, 全文。

(73)专利权人 华南理工大学

闫凤. 核桃蛋白酶解产物的活性初步研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2012, 第65页5.5本章小节部分。

地址 511400 广东省广州市南沙区环市大道南路25号华工大广州产研院

(72)发明人 任娇艳 张榕 赖婷 廖文镇  
林泽华

审查员 王奇

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍

(51) Int. Cl.

C12P 21/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,该方法包括以下步骤:(1)限制性酶解;(2)超滤膜分离;(3)浓缩、喷雾干燥,得到核桃多肽;(4)在核桃多肽溶液中加入锌源进行螯合反应;(5)将螯合液进行透析;(6)冷冻干燥,得核桃多肽-锌螯合物。产品在偏酸性条件下溶解为淡黄色液体。本发明所研制的核桃多肽-锌螯合物,通过细胞实验证明该螯合物具有明显的抗肿瘤生理活性,有望成为治疗癌症尤其是肝癌的高效低毒药剂。

1. 一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1)限制性酶解:将核桃粕,与水混合,加入占核桃粕蛋白质量 0.5~1.5 %的蛋白酶,在 55~60℃酶解;沸水中10~30 min灭酶,离心,取上清液,抽滤,得到核桃粕蛋白多肽;所述核桃粕与水的质量比为 1:7~1:9;所述蛋白酶为木瓜蛋白酶;所述酶解的时间为12~16 h;

(2)超滤膜分离:利用超滤膜对核桃粕蛋白多肽进行分离纯化;超滤膜截留分子量范围为 3 kDa;超滤后收集分子量 < 3kDa 的滤过组分;

(3)浓缩、喷雾干燥:收集超滤后的酶解液于 55~65℃真空旋转蒸发浓缩,所得产物经喷雾干燥制得核桃多肽;

(4)在锌溶液中加入核桃多肽进行螯合反应:将 $ZnCl_2$ 溶于蒸馏水配成 $ZnCl_2$ 溶液,加入多肽溶液后置于漩涡仪混匀,在 50~55℃下震荡反应 20~24 h;

(5)将螯合液进行透析:螯合反应结束后,用透析袋于 4~10 °C对溶液进行透析;

(6)冷冻干燥,得核桃多肽-锌螯合物:对透析后的螯合液冷冻干燥,得到核桃多肽-锌螯合物。

2. 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述核桃粕的蛋白质含量为 40~45 w/w %。

3. 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述核桃粕蛋白酶解液浓缩至固形物 20~ 25 Brix 后喷雾干燥,所得粉末颗粒细度均一。

4. 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于,步骤(4)所述 $ZnCl_2$ 溶液的浓度为 6.0 - 8.0 mg/ml;加入核桃多肽后使其在 $ZnCl_2$ 溶液中的浓度达到 5.0 - 7.0 mg/ml。

5. 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于,步骤(5)所述透析袋的截留分子量为 500 ~1000 Da、透析时间为 20- 24 h。

6. 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,其特征在于,步骤(6)所述冷冻干燥的时间为36~40 h。

## 一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种化合物的制备方法,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法。

### 背景技术

[0002] 锌是人体必需的14种微量元素之一,它不但具有重要的生物功能,而且参与多种酶的合成与组成,与肌体的代谢及某些疾病的发生有极为密切的关系。机体缺锌会导致基础代谢下降、蛋白质利用率降低、食欲与消化功能低下、影响生长发育等多方面的负面影响。

[0003] 第一代补锌剂即无机锌盐,如硫酸锌。无机锌盐易吸潮性、生物利用率低、口感不适,服用后副作用较多,已被人类淘汰。第二代锌盐是以有机弱酸作配体合成的补锌剂,如乳酸锌、葡萄糖酸锌。但其合成复杂,产率低,而且含锌量较低,且不适于糖尿病人的补锌。第三代锌补剂即氨基酸螯合锌,它化学稳定性好,安全、无毒,且生物利用率高。第四代则是多肽-Zn<sup>2+</sup>配合物。多肽的转运系统和游离氨基酸相比,具有耗能低、转运速度快和不易被饱和的特点,此外多肽还具有很好的营养作用:提高氨基酸的利用率,促进蛋白质的合成和矿物质元素的吸收等。

[0004] 核桃粕是核桃榨油后的副产物,含有40%以上的蛋白质。核桃蛋白是一种优质的植物蛋白,含有18种氨基酸,且人体所需的8种必需氨基酸含量合理。但目前大部分优质核桃粕直接当作饲料和肥料处理掉,浪费了许多优质蛋白质资源。

[0005] 为了解决核桃粕资源的浪费及提供一种高效的补锌剂等问题,我们采用限制性酶法改性技术对核桃粕进行深加工并且和无机锌源螯合。核桃多肽-锌螯合物不仅是一种高效的补锌剂,其还具有很高的抗肿瘤活性,在用于补锌剂保健品及药品的制备的同时,有望成为治疗癌症的高效低毒药剂。

[0006] 有关活性多肽-锌螯合物的研究目前甚少,且都只是涉及多肽-锌螯合的制备工艺,并没有研究螯合物的抗肿瘤活性。例如:(1)中国专利申请公布号CN 103626867 A中公开了“一种鱼皮胶原蛋白多肽螯合锌的制备工艺”,该专利中涉及的是对多肽螯合锌工艺条件的优化。(2)中国专利申请公布号CN 101225102 A中公开了“罗非鱼鱼皮多肽螯合锌盐的制备方法”,该专利只是提供了一种鱼皮多肽螯合锌盐的制备方法。(3)中国专利申请公布号CN 103494214 A中公开了“酪蛋白磷酸肽锌螯合物”,该专利涉及的是酪蛋白磷酸肽与锌螯合制备的工艺技术。

[0007] 综上所述,目前关于核桃多肽-锌螯合物的抗肿瘤活性的报道尚无。本发明人以核桃粕为原料,限制性酶解法制备核桃蛋白活性多肽,并与无机锌源进行螯合,经透析,制备具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物。该法制得的产品安全性高,方法简便可大量生产,具有极高的抗肿瘤活性,可发展成为治疗癌症尤其是肝癌的高效低毒药剂。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于通过核桃多肽与无机锌盐制备出具有抗肿瘤活性的螯合物,为相关抗癌药物的开发提供一种基料。

[0009] 一种具有抗肿瘤活性的核桃多肽-锌螯合物的制备方法,包括如下步骤:

[0010] (1)限制性酶解:将核桃粕,与水混合,加入占核桃粕蛋白质量 0.5~1.5 %的蛋白酶,在55~60℃酶解;沸水中10~30 min灭酶,离心,取上清液,抽滤,得到核桃粕蛋白多肽;

[0011] (2)超滤膜分离:利用超滤膜对核桃粕蛋白多肽进行分离纯化;

[0012] (3)浓缩、喷雾干燥:收集超滤后的酶解液于 55~65℃真空旋转蒸发浓缩,所得产物经喷雾干燥制得核桃多肽;

[0013] (4)在锌溶液中加入核桃多肽进行螯合反应:将ZnCl<sub>2</sub>溶于蒸馏水配成ZnCl<sub>2</sub>溶液,加入多肽溶液后置于漩涡仪混匀,在 50~55℃下震荡反应 20~24 h;

[0014] (5)将螯合液进行透析:螯合反应结束后,用透析袋于 4~10℃对溶液进行透析;

[0015] (6)冷冻干燥,得核桃多肽-锌螯合物:对透析后的螯合液冷冻干燥,得到核桃多肽-锌螯合物。

[0016] 上述方法中,步骤(1)所述核桃粕的蛋白质含量为 40~45 w/w %。

[0017] 上述方法中,步骤(1)所述核桃粕与水的质量比为 1:7~1:9;所述蛋白酶为木瓜蛋白酶;所述酶解的时间为12~16 h。

[0018] 上述方法中,步骤(2)所述超滤膜截留分子量范围为 3 kDa;超滤后收集分子量 < 3kDa 的滤过组分。

[0019] 上述方法中,步骤(3)所述核桃粕蛋白酶解液浓缩至固形物 20~ 25 Brix 后喷雾干燥,所得粉末颗粒细度均一。

[0020] 上述方法中,步骤(4)所述ZnCl<sub>2</sub>溶液的浓度为 6.0 - 8.0 mg/ml;加入核桃多肽后使其在ZnCl<sub>2</sub>溶液中的浓度达到 5.0 - 7.0 mg/ml。

[0021] 上述方法中,步骤(5)所述透析袋的截留分子量为 500 ~1000 Da、透析时间为 20- 24 h。

[0022] 上述方法中,步骤(6)所述冷冻干燥的时间为36~40 h。

[0023] 本发明所得核桃多肽-锌螯合物具有抗肿瘤的性能,通过MTT法检测肿瘤细胞存活率及用偏光显微镜和扫描电镜观察处理前后的肿瘤细胞形态等综合指标进行判断的。

[0024] 通过扫描电镜观察多肽-锌螯合物形貌,细胞试验证实本发明所得产品的抗肿瘤效果显著。

[0025] 本发明具有如下优点:

[0026] 1、本发明公布的抗肿瘤活性核桃多肽-锌螯合物制备工艺中利用透析已除去未被螯合的锌离子,且MTT法检测结果显示与单一核桃多肽相比,核桃多肽-锌螯合物的抗肿瘤活性并不是来自单独的多肽,而是通过两者相互作用形成的螯合物才具有的。

[0027] 2、本发明公布的抗肿瘤活性核桃多肽-锌螯合物能明显抑制肝癌细胞HepG2、乳腺癌肿瘤细胞MCF-7、胃癌细胞SCG-7901、肺癌细胞A549以及子宫颈癌细胞HeLa的增殖,其中对肝癌细胞HepG2的抑制作用最为明显。

[0028] 3、本发明公布的抗肿瘤活性核桃多肽-锌螯合物制备工艺简单,产品安全,可规模化生产。

## 附图说明

[0029] 图1为核桃多肽和核桃多肽-锌螯合物分别对正常细胞和不同肿瘤细胞增殖的抑制作用图。

[0030] 图2a-图2d为偏光显微镜观察不同浓度的核桃多肽-锌螯合物对肝癌细胞HepG2的损伤情况图,其中图2a为未与桃多肽-锌螯合物共孵育的细胞,图2b、图2c和图2d分别为75 $\mu$ g/mL、150 $\mu$ g/mL和300 $\mu$ g/mL的核桃多肽-锌螯合物对肝癌细胞HepG2的损伤情况图。

[0031] 图3a-图3d为扫描电镜观察不同培养时间核桃多肽-锌螯合物对肝癌细胞HepG2的损伤情况图,其中图3a为未与桃多肽-锌螯合物共孵育的细胞,图3b、图3c和图3d分别为12 h、24 h和48h核桃多肽-锌螯合物对肝癌细胞HepG2的损伤情况图。

## 具体实施方式

[0032] 本发明通过三种方式检测核桃多肽-锌螯合物对肿瘤细胞的损伤作用:

[0033] (1)MTT法检测肿瘤细胞存活率。通过MTT法分别检测核桃多肽和核桃多肽-锌螯合物对正常肝细胞L02、肝癌细胞HepG2、乳腺癌肿瘤细胞MCF-7、胃癌细胞SCG-7901、肺癌细胞A549以及子宫颈癌细胞HeLa增殖的抑制作用。具体方法如下:用胰蛋白酶消化贴壁细胞制成单细胞悬液,以 $5 \times 10^3$ 个细胞/孔接种 96 孔培养板,置于培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)预培养 24 h后,加入核桃多肽或核桃多肽-锌螯合物的培养基100 $\mu$ L/孔,继续培养48 h。往培养板加入MTT,37 $^{\circ}$ C孵育4 h后弃上清,加入 DMSO,振荡10 min,紫色结晶物充分溶解后,测定各孔OD<sub>570</sub>值。以对照组OD<sub>570</sub>为100%,计算药物处理后各组细胞存活率。细胞存活率(%) = (OD<sub>570</sub>实验组 / OD<sub>570</sub>对照组)  $\times$  100%

[0034] (2)偏光显微镜观察核桃多肽-锌螯合物对HepG2细胞的损伤作用。用胰蛋白酶消化贴壁细胞制成单细胞悬液,以  $5 \times 10^3$ 个细胞/孔接种 6 孔培养板,置于培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)预培养 24 h后,加入含有核桃多肽-锌螯合物的培养基100 $\mu$ L/孔,继续培养 48 h。在200倍偏光显微镜下观察核桃多肽-锌螯合物对HepG2细胞的损伤作用。

[0035] (3)扫描电镜观察核桃多肽-锌螯合物对HepG2细胞的损伤作用。细胞爬片经2.5 % 戊二醛固定后按常规制备样品,扫描电镜(Hitachi TM3000)观察拍照。

[0036] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0037] 实施例 1:

[0038] (1)限制性酶解:将核桃粕(其蛋白质含量为 40%, w/w)与水按质量比1:7混合,加入占核桃粕蛋白质量 0.5 %的中性蛋白酶(广西南宁庞博生物工程有限公司),在55 $^{\circ}$ C酶解 12 h;沸水浴中灭酶10 min,离心,取上清液,抽滤;

[0039] (2)超滤膜分离:利用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜对核桃粕蛋白多肽进行分离纯化,超滤后收集分子量 < 3kDa 的滤过组分;

[0040] (3)浓缩、喷雾干燥:收集超滤后的酶解液于60  $^{\circ}$ C真空旋转蒸发浓缩至固形物 20 ~ 25 Brix ,所得产物经喷雾干燥制得核桃多肽;

[0041] (4)核桃多肽抗肿瘤功效:通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。

[0042] 实施例 2:

[0043] (1)限制性酶解:将核桃粕(其蛋白质含量为 43%,w/w)与水按质量比1:7混合,加入占核桃粕蛋白质量0.5%的木瓜蛋白酶(广西南宁庞博生物工程有限公司),在55℃酶解12 h;沸水中灭酶10 min,离心,取上清液,抽滤;

[0044] (2)超滤膜分离:利用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜对核桃粕蛋白多肽进行分离纯化,超滤后收集分子量 < 3kDa 的滤过组分;

[0045] (3)浓缩、喷雾干燥:收集超滤后的酶解液于60℃真空旋转蒸发浓缩至固形物 20 Brix,所得产物经喷雾干燥制得核桃多肽;

[0046] (4)在锌溶液中加入核桃多肽进行螯合反应:将ZnCl<sub>2</sub>溶于蒸馏水配成浓度为 6.0 mg/ml的溶液,加入核桃多肽后使其在终溶液的浓度达到 5.0 mg/ml,置于漩涡仪混匀,在50℃下震荡反应 24 h;

[0047] (5)将螯合液进行透析:螯合反应结束后,用截留分子量为 500 Da的透析袋于 4℃对溶液进行透析 20 h;

[0048] (6)冷冻干燥,得核桃多肽-锌螯合物:对透析后的螯合液冷冻干燥 36 h,得到核桃多肽-锌螯合物,通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。

[0049] 实施例 3:

[0050] (1)限制性酶解:将核桃粕(其核桃粕蛋白质含量为 45%,w/w)与水质量比1:9混合,加入占核桃粕蛋白质量 1.5%的木瓜蛋白酶(广西南宁庞博生物工程有限公司),在 60℃酶解 16 h;沸水中灭酶10 min,离心,取上清液,抽滤;

[0051] (2)超滤膜分离:利用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜对核桃粕蛋白多肽进行分离纯化,超滤后收集分子量 < 3kDa 的滤过组分;

[0052] (3)浓缩、喷雾干燥:收集超滤后的酶解液于60℃真空旋转蒸发浓缩至固形物 25 Brix,所得产物经喷雾干燥制得核桃多肽;

[0053] (4)在锌溶液中加入核桃多肽进行螯合反应:将ZnCl<sub>2</sub>溶于蒸馏水配成浓度为 8.0 mg/ml的溶液,加入核桃多肽后使其在终溶液的浓度达到 7.0 mg/ml,置于漩涡仪混匀,在50℃下震荡反应 24 h;

[0054] (5)将螯合液进行透析:螯合反应结束后,用截留分子量为 500 Da的透析袋于 4℃对溶液进行透析 24 h;

[0055] (6)冷冻干燥,得核桃多肽-锌螯合物:对透析后的螯合液冷冻干燥 40 h,得到核桃多肽-锌螯合物,通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。

[0056] 由图1可观察得到核桃多肽-锌螯合物的抗肿瘤活性并不是来自单独的多肽(实施例1),而是通过与无机锌形成螯合物才具有的(实施例2、3)。核桃多肽-锌螯合物对正常肝细胞L02、肝癌细胞HepG2、乳腺癌肿瘤细胞MCF-7、胃癌细胞SCG-7901、肺癌细胞A549以及子宫颈癌细胞He1a增殖都有抑制作用,其中对HepG2细胞的抑制作用最为明显,而对正常肝细胞影响不大。这表明,该核桃多肽-锌螯合物不仅对肿瘤细胞和正常细胞间有选择性,而且对不同的肿瘤细胞也有一定的选择性,具有应用于肿瘤治疗的潜力。此外,实施例3所得核桃多肽-锌螯合物的抗肿瘤活性远高于实施例2,说明不同调控条件对于所得核桃多肽-锌螯合物的活性有重要影响。核桃多肽-锌螯合物对HepG2细胞增殖的抑制作用最为明显,所以选择HepG2细胞继续用偏光显微镜和扫描电镜进行观察。

[0057] 将不同浓度核桃多肽-锌螯合物(75μg/mL(图2b)、150 μg/mL(图2c)及 300 μg/mL

(图2d))与肝癌细胞HepG2共孵育24 h,其结果如图2a-图2d所示,由图2a-图2d中可观察得到细胞出现皱缩、变圆、脱落,最后变成细胞残片。

[0058] 将桃多肽-锌螯合物 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )与肝癌细胞HepG2分别共孵育12 h(图3b)、24 h(图3c)、48 h(图3d),利用扫描电镜观察桃多肽-锌螯合物对HepG2细胞的损伤作用。由图3中可观察得到细胞出现凋亡特征:细胞缩小,细胞发生明显萎缩。

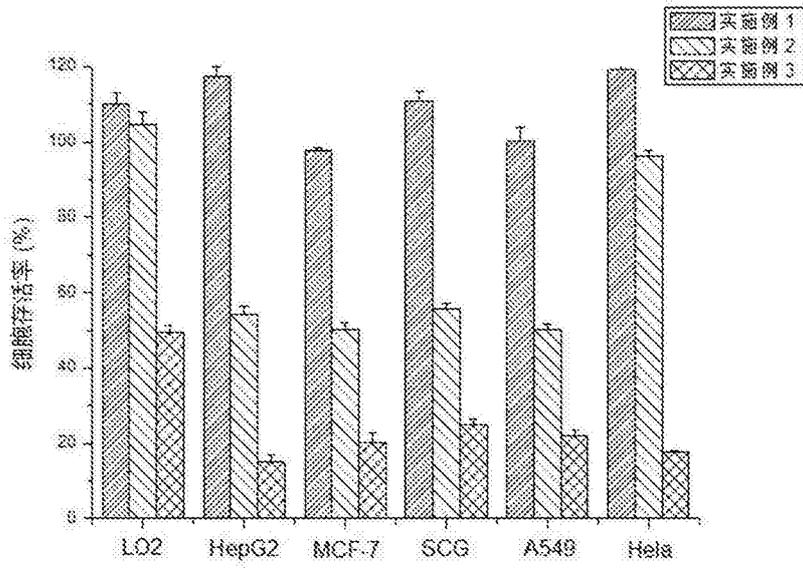


图1

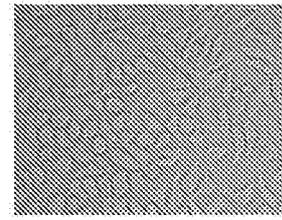


图2a

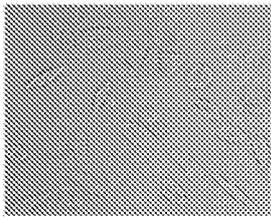


图2b

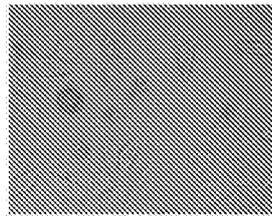


图2c

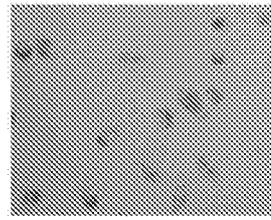


图2d

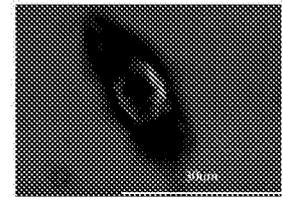


图3a

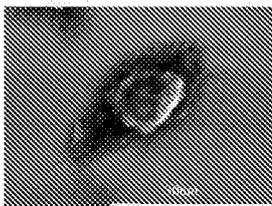


图3b

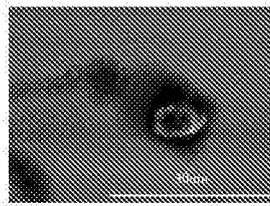


图3c

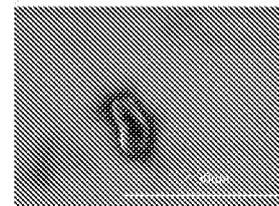


图3d